



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0714744-9 A2**

(22) Data de Depósito: 05/09/2007
(43) Data da Publicação: 07/05/2013
(RPI 2209)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/68
C12Q 1/68

(54) **Título:** MÉTODO IMUNOLÓGICO E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR UMA INFECÇÃO

(30) **Prioridade Unionista:** 05/09/2006 DK PA200601145, 20/02/2007 DK PA200700262

(73) **Titular(es):** HVIDOVRE HOSPITAL

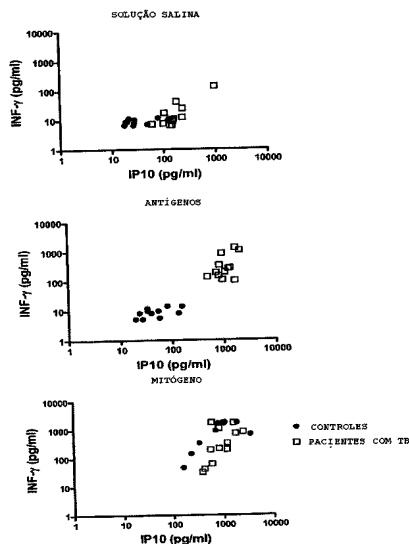
(72) **Inventor(es):** JESPER EUGEN-OLSEN, MORTEN RUHWALD, PEMILLE RAVN

(74) **Procurador(es):** David do Nascimento Advogados Associados

(86) **Pedido Internacional:** PCT DK2007000399 de 05/09/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/028489de 13/03/2008

(57) **Resumo:** MÉTODO IMUNOLÓGICO E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR UMA INFECÇÃO. A presente invenção refere-se a um método imunológico e, mais particularmente, a um método para medir a reatividade imunológica medida por células (CMI) nos mamíferos com base na produção de IP-10. A invenção também apresenta um ensaio e um kit para medir a CMI para um antígeno utilizando sangue integral ou outras amostras biológicas apropriadas. Os métodos da presente invenção são úteis em protocolos terapêuticos e de diagnóstico para o ser humano, animais domésticos e aplicações veterinárias e da vida selvagem, e desse modo a invenção também se refere a um método para diagnosticar uma infecção em um mamífero.



MÉTODO IMUNOLÓGICO E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR UMA INFECÇÃO

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um ensaio
5 imunológico e, mais particularmente, a um ensaio para medir a reatividade imunológica medida por células (CMI). Ainda mais particularmente, a presente invenção apresenta um ensaio e um kit para medir uma resposta mediada por células a um antígeno ao utilizar o sangue integral ou outras amostras biológicas
10 apropriadas. O ensaio é útil em protocolos terapêuticos e de diagnóstico para em seres humanos, animais domésticos e aplicações veterinárias e da vida selvagem.

A medição de imunorespostas mediadas por células é importante para o diagnóstico de imunidade de muitas doenças
15 infecciosas e autoimunológicas, tal como um marcador para a imunocompetência, e para a detecção de respostas de células T aos antígenos endógenos e exógenos (isto é, infecções e vacinas).

A presente invenção apresenta um método para a
20 medição da CMI em um mamífero mediante a incubação de uma amostra do mamífero que compreende células T ou outras células do sistema imunológico com um antígeno. A produção de IP-10 é então detectada. A presença ou o nível do efector imunológico é então indicativa do nível de resposta mediada
25 por células do indivíduo.

Antecedentes da Invenção

Tuberculose

A descoberta de antígenos imunodominantes específicos de
(MTB) *Mycobacterium tuberculosis* conduziram a uma nova
30 avenida significativa para o diagnóstico da tuberculose (TB). O trabalho inicial tinha mostrado o potencial da substituição do teste de pele de tuberculina (TST) por um teste que ensaiou a produção in vitro de interferon gama (IFN- γ) por

células T em resposta aos antígenos de MTB definidos. Aproximadamente ao mesmo tempo, um grande avanço foi a descoberta de antígenos altamente imunogênicos, o alvo antigênico secretado inicialmente 6 (ESAT-6) e proteína de filtrado de cultura 10 (CFP-10) e do TB7.7 que melhoraram a especificidade significativamente. Estes antígenos são codificados dentro da região de diferença 1 (RD1) do patógeno e são conseqüentemente ausentes de todas as cepas de vacina de Bacille Calmette Guerin (BCG) e da maioria das micobactérias não-tuberculosas (as exceções incluem o Mycobacterium kansasii, Mycobacterium marinum e Mycobacterium szulgai). As respostas de IFN- γ aos peptídeos sobrepostos dos antígenos codificados por RD1 ESAT-6, CFP-10, TB7.7 formam a base para a detecção da infecção de MTB em dois testes licenciados e comercialmente disponíveis.

O QuantiFERON-TB Gold (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Austrália), um imunoensaio ligado por enzima de sangue integral (ELISA) tem a aprovação da marca CE europeia e a aprovação americana recentemente recebida da American Food and Drug Administration (FDA) para a detecção da infecção latente e da doença de TB.

O T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, Reino Unido), um ensaio de imunomancha ligado por enzima (ELISPOT) que utiliza células mononucleares de sangue periférico tem a aprovação da marca europeia CE e foi aprovado para o uso no Canadá em 2005. O T-SPOT.TB utiliza somente ESAT-6 e CFP10.

No entanto, as limitações dos testes atualmente disponíveis são:

- 1) a sensibilidade pode ser prejudicada nos indivíduos imunossuprimidos (tais como aqueles HIV positivos ou os pacientes que recebem medicação imunossupressora),

- 2) em algumas situações um volume relativamente grande de sangue é necessário (3 ml por teste de QuantiFERON

e 8 ml para o T-SPOT.TB), o que pode limitar o seu uso nos bebês e nas crianças gravemente doentes e anêmicas,

3) os testes não discriminam entre infecção ativa, latente e recente,

5 4) não foi demonstrado que os testes podem predizer quem irá progredir de TB recente ou latente para TB ativo.

A maioria das limitações dos testes é devida à medição do parâmetro de efeito de IFN- γ a níveis muito baixos, perto do limite até mesmo do método mais sensível (no teste de QuantiFERON até 0,35 IU/ml (17,5 pg/ml) e nos locais/campo de T-SPOT.TB 5). A redução no corte para realçar a sensibilidade irá resultar eventualmente em uma especificidade prejudicada dos testes. Uma publicação recente baseada no teste de QuantiFERON mostrou que os testes repetidos de pessoas com resultados de testes na faixa inferior de IFN- γ varia em torno do nível de corte que é subjacente ao risco potencial de resultados falsos positivos e falsos negativos do teste de QuantiFERON (QFT) (Pai, M. et al).

20 Para superar a fragilidade evidente dos testes, a sensibilidade poderia ser melhorada ao utilizar antígenos específicos adicionais de M. tuberculosis e isto foi feito na terceira geração dos testes de QuantiFERON (QFT), o teste QuantiFERON em tubo (QFT-IT) que compreende agora um antígeno adicional denominado TB7.7(p4) e a sensibilidade é melhorada potencialmente, mas ainda depende das medições a níveis muito baixos de IFN- γ .

Esta abordagem foi tentada por outros, isto é, foi recentemente mostrado que a Monocina induzida por IFN- γ (MIG/CXCL9) foi expressa especificamente in vitro após a estimulação com os antígenos específicos de M. tuberculosis (ESAT-6/CFP10) e PPD. A sensibilidade de CXCL9 era, no

entanto, muito baixa e mais baixa do que aquela de IFN- γ . Um outro estudo menor baseado na citometria de citocina intracelular em células CD4+ T depois da estimulação de ESAT-6, testada se a expressão de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 ou do marcador de ativação CD40L poderia distinguir a TB da doença que não TB. Nenhum destes marcadores demonstrou ser comparável ou superior a IFN- γ (Abramo C, et al.) (Hughes, A. et al.).

Contudo, nenhum marcador sensível e específico para substituir IFN- γ para o diagnóstico da infecção de TB foi identificado na literatura presentemente publicada. Vários descreveram IP-10 em conexão a infecções, mas não como um marcador no diagnóstico da infecção com uma estimulação de antígeno anterior.

15 Chlamydia

O diagnóstico das infecções genitais causadas por Chlamydia evoluiu rapidamente a partir dos anos noventa. Os testes de amplificação de ácido nucléico (NAAT), tais como a reação de cadeia de polimerase (PCR), a amplificação mediada por transcrição (TMA), e o ensaio de deslocamento de cordão de DNA (SDA) são agora os suportes principais. Os NNATs de Chlamydia mais comumente utilizados e extensamente estudados nos Estados Unidos e em muitos outros países industrializados são: Aptima (Gen-Probe), Probe-Tec (Becton-Dickinson), e Amplikor (Roche). O Aptima Combo II testa simultaneamente C. trachomatis e Neisseria gonorrhoeae, a causa da gonorréia. Os NAATs para Chlamydia podem ser realizados nos espécimes de cotonete coletados do cervix (mulheres) ou da uretra (homens).

30 Atualmente, os NAATs têm a aprovação reguladora somente para os testes de espécimes urogenitais. Os NAATs substituíram bastante a cultura, o padrão Gold histórico para

o diagnóstico de Chlamydia, e os testes de sonda não-amplificada, tais como Pace II (Gen-Probe). Este último teste é relativamente insensível, detectando com sucesso somente 60-80% das infecções em mulheres assintomáticas, e ocasionalmente fornecendo falsos resultados positivos. A cultura permanece útil em circunstâncias selecionadas e é atualmente o único ensaio aprovado para os testes de espécimes não-genitais.

O diagnóstico de Chlamydia é baseado desse modo em uma tecnologia complicada e que requer recursos, tal como PCR, não imediatamente disponível no mundo em desenvolvimento. Uma tecnologia rápida e fácil deve melhorar as medições de diagnóstico para esta doença importante.

A patente CA 2.478.138 divulga que os níveis elevados no sangue do polipeptídeo quimiocina CXCL10 estão associados com as doenças respiratórias (por exemplo, SARS, influenza e pneumonia adquirida em comunidade) e são úteis no diagnóstico dos pacientes. Os métodos são fornecidos para o diagnóstico e o tratamento dos pacientes que sofrem de doenças respiratórias.

O pedido de patente WO 05/091969 divulga que marcadores para TSE (Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis) que estão presentes antes da formação da proteína de príon patológico detectável são úteis na detecção desta infecção antes dos sinais clínicos. O IP-10 é apenas um de vários marcadores descritos e esse pedido de patente não apresenta nenhuma estimulação de antígeno.

O pedido de patente US2004-038201 apresenta os programas distintos da expressão de genes ativados em resposta aos patógenos diferentes em macrófagos. O IP-10 é outra vez apenas um em muitos marcadores mencionados e esse pedido não apresenta nenhuma estimulação de antígeno.

Annalisa Azzurri et al. afirmam que a proteína induzível por IFN- γ 10 e os níveis de plasma de pentraxin 3 são ferramentas para monitorar a inflamação e a atividade da doença na infecção de Mycobacterium Tuberculosis. O artigo
5 mostra que o nível de plasma IP-10 está aumentado espontaneamente nos pacientes com TB, e outra vez esta referência não apresenta nenhuma estimulação de antígeno.

O pedido de patente WO 03/063759 apresenta um método de identificação de um peptídeo derivado da proteína
10 de choque térmico (Hsp) útil para o diagnóstico ou a terapia. O efeito dos compostos da presente invenção foi testado em monócitos de sangue periférico ao medir o nível de IP-10 em resposta à estimulação subsequente com LPS. A estimulação direta com os compostos do teste sem a estimulação
15 subsequente com LPS não causou um aumento no nível de IP-10.

O pedido de patente WO 07/039400 apresenta um método e um kit para o diagnóstico da Síndrome de Restauração Imunológica que é associada com a tuberculose (TB-IRS) nos
20 pacientes infectados com tuberculose, assim como nos pacientes co-infectados com HIV/TB. A fim de diagnosticar a TB-IRS, os autores da presente invenção detectaram o nível da resposta de Th1 contra PPD e/ou uma proteína de 16 KDA em comparação à resposta de Th1 contra ESAT-6, CFP-10, 85B (controle negativo) e utilizaram uma elevação na resposta de
25 Th1 como um indicativo da TB-IRS.

Para superar os problemas da sensibilidade prejudicada e níveis baixos de IFN- γ detectáveis pelos testes atualmente disponíveis ao utilizar a estimulação de antígeno, os autores da presente invenção sugerem o uso de um
30 biomarcador alternativo no lugar de IFN- γ .

Descrição Resumida da Invenção

A presente invenção propõe um novo princípio do diagnóstico. Um sistema de teste que pode detectar a infecção, por exemplo, com tuberculosis leishmania ou chlamydia, baseado na medição de quimiocina IP-10 depois da
5 estimulação de imunocélulas com proteínas antigênicas/peptídeos.

O sistema de teste descrito IP-10 é mais sensível do que os testes baseados em IFN- γ e como parâmetro de efeito ele melhoram os testes e o diagnóstico. O teste pode ser
10 realizado ao utilizar quantidades mais baixas de sangue porque as amostras podem ser diluídas no momento da incubação, ou, antes da análise. O teste pode ser realizado em um tempo de incubação mais curto. Além disso, o sistema de teste pode permitir a discriminação entre vários estágios de
15 infecção tais como, por exemplo, a infecção ativa, recente e latente de TB.

Resumidamente, a presente invenção pode ser descrita como um método imunológico que compreende as etapas de incubação de uma amostra obtida de um mamífero com pelo
20 menos um antígeno, a determinação do nível de IP-10 na dita amostra e a comparação do dito nível de IP-10 determinado com um nível de referência, desse modo determinando se o mamífero encontrou previamente o antígeno que gera reatividade imunológica ao antígeno, ou se encontrou previamente outros
25 antígenos que geram retroreatividade imunológica ao antígeno.

Descrição Detalhada

A presente invenção apresenta um ensaio do potencial ou da capacidade de um indivíduo montar uma resposta a CMI. O ensaio é baseado na medição da produção de
30 molécula de imunofetor pelas células do sistema imunológico em resposta à estimulação antigênica. Os imunofetores podem ser detectados ao utilizar ligandos tais como os anticorpos

específicos para os efetores ou ao medir o nível da expressão dos genes que codificam os efetores.

A presente invenção apresenta, portanto, um meio para determinar a resposta de CMI em um indivíduo e, por sua vez, fornece meios para o diagnóstico de doenças infecciosas, condições patológicas, nível de imunocompetência e um marcador de resposta de células T aos antígenos endógenos ou exógenos.

Um aspecto da invenção refere-se a um ensaio do potencial ou da capacidade de um indivíduo montar uma resposta a IP-10. O ensaio é baseado na medição da produção de IP-10 por célula do sistema imunológico em resposta à estimulação antigênica. A produção de IP-10 pode ser detectada ao utilizar ligandos tais como os anticorpos específicos para IP-10 ou ao medir o nível da expressão dos genes que codificam IP-10. Os autores da presente invenção demonstraram o princípio do teste ao utilizar dois tipos diferentes de infecção: Tuberculosis e Chlamydia. No caso da tuberculose, um teste baseado na estimulação específica de *M. Tuberculosis* e na determinação subsequente de IP-10, pode identificar as pessoas infectadas com *M. tuberculosis*. No caso de *Chlamydia* um teste baseado na estimulação com extrato de *C. Trachomatis* pode identificar as pessoas infectadas com *Chlamydia*.

O sistema de teste descrito mede os níveis mais elevados do biomarcador IP-10 do que os níveis de IFN- γ , o marcador no qual os ensaios atualmente disponíveis são baseados. O sistema de teste baseado em IP-10 é tão específico quanto e mais sensível do que os testes baseados, por exemplo, em IFN- γ como parâmetro de efeito, ele melhora os testes e os diagnósticos de indivíduos imunocomprometidos (Exemplo 10), o teste pode ser realizado ao utilizar

quantidades mais baixas de sangue, uma vez que as amostras podem ser diluídas no momento da incubação ou antes da análise (Exemplos 9 e 13). Ele também aumenta a velocidade do diagnóstico, porque o IP-10 é produzido em quantidades
5 significativas poucas horas depois da incubação, tal como mostrado no Exemplo 11. No caso da tuberculose, o sistema de teste pode permitir a discriminação entre infecção ativa, recente e latente de TB e, além disso, o sistema de teste é potencialmente capaz de identificar pessoas com risco de
10 progredir para a TB ativa. O sistema de teste é baseado na detecção de IP-10 ao utilizar um imunoenensaio (isto é, ELISA ou Luminex) e o sistema de teste pode ser potencialmente desenvolvido como um teste imunocromatográfico amigável de campo aplicável em configurações de baixos recursos, onde o
15 resultado de teste é apresentado por uma reação de cor detectável a olho nu.

O ensaio descrito na presente invenção resolve uma série de problemas.

Os ensaios atualmente disponíveis medem o parâmetro
20 de efeito IFN- γ a níveis muito baixos, perto do limite até mesmo do método de detecção mais sensível (no caso de testes de tuberculose, o teste de QuantiFERON tem um nível de corte para o teste positivo a 0,35 unidade internacional/ml (17,5 pg/ml) e no teste T-SPOT.TB 5 unidades de formação
25 locais/campo). A diminuição de corte para realçar a sensibilidade irá resultar eventualmente em uma especificidade prejudicada dos testes. As publicações baseadas no teste de Quantiferon mostraram que os testes repetidos de pessoas com resultados de teste na faixa
30 inferior de IFN- γ variam em torno do nível de corte que é subjacente ao risco potencial de resultados falsos negativos e falsos positivos do teste de Quantiferon (QFT). Além disso,

o teste atual pode resultar em resultados falsos negativos nos indivíduos imunossuprimidos que não conseguem montar uma resposta a IFN- γ acima do nível de corte. Uma vez que a quantidade de liberação de IP-10 é muito mais elevada após a
5 estimulação do antígeno quando comparado a IFN- γ , a sensibilidade é mais elevada, poucos testes são considerados falsos negativos, os resultados dos testes são mais reproduzíveis, e resultados de testes menos indeterminados são esperados nos indivíduos imunossuprimidos.

10 Além disso, uma vez que o IP-10 induzido por antígeno é secretado em tais concentrações elevadas, é possível diluir a amostra antes ou depois da etapa de incubação. Isto significa que a quantidade de material de amostra (por exemplo, sangue integral) necessária para a
15 realização do teste pode ser reduzida, por exemplo, no caso do sangue integral para baixo para ou até ou abaixo de 0,25 ml, tal como 0,20 ml, por exemplo, 0,15 ml, tal como 0,1 ml, por exemplo, 0,05 ml. Em uma realização preferida, o teste pode ser realizado para baixo para ou até abaixo de 0,1 ml.
20 Desse modo um "mini-ensaio" apropriado para pacientes com baixo volume de sangue (por exemplo, crianças/bebês ou anêmicos) pode ser desenvolvido. Além disso, ao utilizar, por exemplo, o sangue de, por exemplo, uma picada no dedo, o mini-ensaio pode ser realizado até mesmo de uma maneira mais
25 amigável ao usuário, uma vez que a perfuração da veia é evitada.

Além disso, no caso da tuberculose, nenhum dos testes atualmente disponíveis pode discriminar entre infecção ativa e latente. Surpreendentemente, os autores da presente
30 invenção encontraram a concentração de IP-10 no material de amostra não-estimulado, mas incubado, isto é, a amostra Nil (por exemplo, sangue integral) é maior entre pacientes com a

doença ativa em comparação aos indivíduos saudáveis com a doença latente. Os autores da presente invenção propõem que a concentração de IP-10 no material de amostra incubado com uma solução inativa (nula) em combinação com um teste específico de antígeno possa ser utilizada como marcador para a infecção 5 ativa (por exemplo, tuberculose) contra a infecção latente (por exemplo, tuberculose).

O ensaio

Desse modo, um aspecto da presente invenção refere-se a um método imunológico que compreende as etapas de: 10

a) incubação de uma amostra obtida de um mamífero com pelo menos um antígeno de teste,

b) determinação do nível de IP-10 na dita amostra,

c) comparação do dito nível de IP-10 determinado 15 com um nível de referência, determinando desse modo se o mamífero encontrou previamente o antígeno de teste para gerar reatividade imunológica ao antígeno de teste ou encontrou previamente outros antígenos para gerar a retroreatividade imunológica ao antígeno de teste.

20 Deve ser compreendido que qualquer um dos métodos descritos na presente invenção é independente da plataforma. Consequentemente, qualquer método imunológico tal como, mas sem ficar a eles limitado, ELISA, Luminex, multiplex, Imunotransferência, ensaios TRF, ensaios de fluxo lateral 25 imunocromatográficos, Técnicas de Imunoensaio Multiplicado com Enzima, teste de RAST, radioimunoensaios, imunofluorescência e vários ensaios de bastão seco imunológicos (por exemplo, teste de bastão cromatográfico) podem ser aplicáveis à presente invenção.

30 Em um segundo aspecto, a presente invenção refere-se a um método para diagnosticar uma infecção, em que o dito método compreende as etapas de:

a) incubação de uma amostra obtida de um mamífero com pelo menos um antígeno de teste contanto que o dito antígeno de teste não seja PPD ou LPS,

b) determinação do nível de IP-10 na dita amostra,

5 c) comparação do nível de IP-10 determinado com um nível de referência, determinando desse modo se o dito mamífero foi infectado com um microorganismo, se o nível de IP-10 determinado estiver acima do nível de referência.

Os autores da presente invenção demonstraram que a
10 estimulação direta com o(s) antígeno(s) de teste ou o(s) antígeno(s) selecionados para a avaliação é suficiente para obter uma leitura que permita que um elemento versado na técnica conclua se a amostra encontrou o(s) antígeno(s) de teste para gerar reatividade imunológica ao(s) antígeno(s) de
15 teste ou encontrou previamente outros antígenos de teste para gerar a retroreatividade imunológica ao(s) antígeno(s) de teste escolhido(s).

Desse modo, em uma realização, a presente invenção também se refere aos métodos imunológicos tal como aqui
20 descrito, em qualquer estimulação adicional ou subsequente é excluída.

A estimulação subsequente ou adicional pode cobrir qualquer tipo de estimulação, por exemplo, priming ou uma amostra com uma substância inativa biológica ou uma
25 substância com um efeito biológico relacionado à resposta inflamatória, tal como, mas sem ficar a eles limitada, mitógenos, produtos bacterianos ou proteínas ativas biológicas.

Desse modo, em uma realização, a presente invenção
30 refere-se aos métodos imunológicos tal como aqui descrito, qualquer estimulação subsequente ou adicional com LPS é excluída.

Consequentemente, o dito método é aplicável para a detecção de uma infecção, por exemplo, nas pessoas que estão em alto risco de desenvolver doenças infecciosas, tais como, mas sem ficar a elas limitadas, tuberculose, Chlamydia, 5 Leishmania, Trypanosoma e Schistosoma.

A presente invenção também se refere a um método de acordo com a presente invenção, em que a amostra é dividida em pelo menos duas frações e compreende

a) a incubação da primeira fração de amostra com 10 o(s) antígeno(s) de teste para gerar uma amostra de resposta,

b) a incubação da segunda fração de amostra com uma solução inativa para gerar uma amostra Nil,

c) a determinação do nível de IP-10 nas duas frações,

15 d) a determinação da resposta de IP-10 dependente de antígeno da amostra ao subtrair o nível de IP-10 determinado na amostra Nil do IP-10 determinado na amostra de resposta,

e) a comparação da resposta de IP-10 dependente de 20 antígeno de teste ou um valor derivado do mesmo com o nível de referência ou um valor derivado do mesmo,

desse modo determinando se o mamífero encontrou previamente o(s) antígeno(s) de teste e desse modo gerando a reatividade imunológica ao(s) antígeno(s) de teste ou encontrou 25 previamente outros antígenos para gerar a retroreatividade imunológica ao(s) antígeno(s) de teste e/ou vai desenvolver a infecção.

Em uma realização, o desempenho do ensaio pode ser potencializado pela adição concomitante de uma molécula 30 imunoestimuladora com o antígeno selecionado para a avaliação, em que a dita molécula imunoestimuladora é uma citocina selecionada do grupo não-limitador que consiste em IL-2, IL-12, TNF- α , e IFN- γ .

Em uma outra realização, a molécula imunoestimuladora é um receptor solúvel (por exemplo dímero ou polímero das moléculas B7 (CD80/CD86)) ou um anticorpo (por exemplo um anticorpo de ligação de CD28).

5 Em uma outra realização, a molécula imunoestimuladora tem a propriedade de fornecer às células T um sinal co-estimulador (conhecido pelos elementos versados na técnica como sinal 2), e o dito sinal co-estimulador não consegue induzir uma resposta a IP-10 sozinho mas irá
10 aumentar a resposta a IP-10 se as células gerarem uma resposta de CMI ao antígeno selecionado para a avaliação.

Em uma outra realização, a potencialização do ensaio pode ser conseguida ao inibir os processos anti-inflamatórios que ocorrem durante a etapa de incubação. Em
15 uma realização, o ensaio pode ser potencializado com a inibição de anticorpos ou receptores solúveis que ligam moléculas anti-inflamatórias tais como, mas sem ficar a elas limitadas, IL-4, IL-10 e TGFR.

Em uma outra realização, a potencialização do
20 ensaio pode ser conseguida pela inibição da anti-inflamação mediada através da inibição ou da eliminação da população de células que agem de maneira inibidora à resposta de CMI, tal como células T reguladoras.

Especificamente tal como aqui utilizado, o termo
25 Derivado de Proteína Purificado (PPD ou tuberculina) é um precipitado de moléculas não-específicas de espécies. O PPD ou tuberculina é obtido mediante a extração de proteínas de uma mistura de M. tuberculosis ou outras micobactérias tais como M. avium. O PPD é empregado geralmente para os testes
30 quanto à presença de imunidade celular ou a resposta a Th1 gerada contra BCG ou então contra M. tuberculosis. Por exemplo, ele pode ser obtido junto a TubersoIB of Connaught Laboratories Limited preparado a partir de uma Batelada

Principal, Connaught Tuberculin (CT68), ou na forma de RT23 obtido junto ao Statens Serum Institute (SSI, Copenhagen, Dinamarca).

A proteína ESAT-6 (alvo antigênico 6 secretado inicialmente) é um antígeno secretado principal que foi purificado dos filtrados de cultura de curta duração de *M. tuberculosis*. Tal como aqui indicado, ESAT-6, CFP-10 (a proteína do filtrado de cultura 10) e 85B podem ser obtidos a partir do lisato de célula e da purificação, por técnicas recombinantes, ou ser produzidos como peptídeos sintéticos. Por exemplo, ESAT6 pode ser obtido como uma proteína recombinante junto ao Statens Serum Institute.

A tuberculina ou PPD (derivado de proteína purificada) difere de ESAT-6, (alvo antigênico 6 secretado inicialmente), CFP-10 (proteína de filtrado de cultura 10), e TB7.7 que são codificados pelos genes (na região RD-1) localizados somente dentro do genoma de *M. tuberculosis* e não contidos em BCG (Bacille de Calmette et Guérin). Ela difere de PPD porque o PPD também contém outros antígenos que são compartilhados, por exemplo, com sub-cepas de BCG e com várias espécies micobacterianas não-tuberculosas com baixa ou nenhuma patogenicidade.

Opcionalmente, o método também pode compreender a divisão da amostra em três frações e a incubação da terceira fração de amostra com um ativador de células T para gerar um controle positivo. Aqui as imunocélulas podem ser incubadas, por exemplo, em três populações separadas: controle Nil (por exemplo, solução salina), estimuladas por AG (por exemplo, proteínas específicas de *Chlamydia* ou de tuberculose ou os seus derivados) e controle positivo (por exemplo, Fitoemaglutinina). As imunocélulas podem estar na forma de sangue integral, sangue integral diluído ou várias purificações da população de células tais como células

mononucleares do sangue periférico, monócitos ou células T. As células podem ser obtidas a partir do sangue, da urina, de fluido pleural, de fluido bronquial, de lavagens orais, de biópsias de tecidos, ascites, pus, fluido cerebrospinal, aspiradas, e/ou de fluido folicular. As imunocélulas incubam, por exemplo, de 4 a 24 horas a 37°C.

Em uma realização, a amostra é dividida em pelo menos duas frações e compreende:

a) a incubação da primeira fração de amostra com o antígeno para gerar uma amostra de resposta,

b) a incubação da segunda fração de amostra com uma solução inativa para gerar uma amostra Nil,

c) a determinação do nível de IP-10 nas duas frações,

d) a determinação da resposta a IP-10 dependente de antígeno da amostra ao subtrair o nível de IP-10 determinado na amostra Nil de IP-10 determinado na amostra de resposta,

e) a comparação da resposta a IP-10 dependente de antígeno ou um valor derivado do mesmo com o nível de referência ou um valor derivado do mesmo,

f) a comparação da resposta a IP-10 espontânea do antígeno ou um valor derivada do mesmo com o nível de referência ou um valor derivado do mesmo,

desse modo determinando se o mamífero encontrou previamente o antígeno, e desse modo gera a reatividade imunológica ao antígeno ou encontrou previamente outros antígenos para gerar a retroreatividade imunológica ao antígeno e desse modo determina se o mamífero tem uma infecção ativa, recente ou latente se o mamífero estiver respondendo ao tratamento, ou vai desenvolver a infecção.

Mais especificamente, a amostra é dividida em pelo menos três frações e compreende:

a) a incubação da primeira fração de amostra com o antígeno para gerar uma amostra de resposta,

b) a incubação da segunda fração de amostra com uma solução inativa para gerar uma amostra Nil,

5 c) a incubação da terceira fração de amostra com uma solução estimuladora (por exemplo, PHA) para gerar uma amostra do mitógeno,

c) a determinação do nível de IP-10 nas três frações,

10 d) a determinação da resposta a IP-10 dependente de antígeno da amostra ao subtrair o nível de IP-10 determinado na amostra Nil do IP-10 determinado na amostra de resposta,

e) a comparação da resposta a IP-10 dependente de antígeno ou um valor derivado do mesmo com o nível de referênciã ou um valor derivado do mesmo,

f) a determinação da resposta a IP-10 dependente de mitógeno da amostra ao subtrair o nível de IP-10 determinado na amostra Nil do IP-10 determinado na amostra do mitógeno,

20 g) a comparação da resposta a IP-10 dependente de mitógeno ou um valor derivado do mesmo com o nível de referênciã ou um valor derivado do mesmo,

h) a comparação da resposta a IP-10 espontânea de antígeno ou um valor derivado do mesmo com o nível de referênciã ou um valor derivado do mesmo,

25 desse modo determinando se o mamífero encontrou previamente o antígeno e gerando desse modo a reatividade imunológica ao antígeno ou encontrou previamente outros antígenos para gerar o retroreatividade imunológica ao antígeno e desse modo determina se o mamífero tem uma
30 infecção ativa, recente ou latente, ou se o mamífero estiver respondendo ao tratamento, vai desenvolver a infecção, ou é imunossuprimido.

O termo "mitógeno" refere-se a qualquer produto químico ou composição química que promove a divisão celular. Os mitógenos podem agir em ambas as células T e as células B separada ou simultaneamente. Consequentemente, o termo
5 mitógeno também engloba os termos ativador de células T e ativador de células B, e é desse modo aqui utilizado intercambiavelmente.

Os mitógenos da presente invenção englobam todos os mitógenos conhecidos de um elemento versado na técnica, tal
10 como, mas sem ficar a eles limitados, fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (conA), lipopolissacarídeo (LPS) e mitógeno de erva-dos-cancros (PWM). Em uma realização preferida da presente invenção, o mitógeno é um ativador de células T, e mesmo mais preferivelmente o mitógeno é PHA. Em
15 uma outra realização preferida da presente invenção, o mitógeno é um ativador de monócito/macrófago.

A produção de IP-10 é então determinada por qualquer método de detecção de citocina ou de quimiocina conhecido pelo elemento versado na técnica, tal como, mas sem
20 ficar a elas limitado, as tecnologias baseadas em anticorpos, por exemplo, xMAP, multiplexação, Luminex, ELISA, ELISPOT, ensaio de bastão lateral ou as técnicas baseadas em mRNA tais como a reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) ou a citometria de fluxo intracelular (IC-FACS).

25 A quantidade de IP-10 em resposta aos antígenos (por exemplo, antígenos de extrato de Chlamydia ou proteínas específicas da tuberculose ou os derivados destes) pode ser determinada ao subtrair a produção base de IP-10, e a infecção provável, por exemplo, com M. tuberculosis é
30 interpretada com base nesta resposta a IP-10 específica de antígeno.

Os dados da tuberculose no presente pedido de patente são desenvolvidos ao utilizar a tecnologia existente:

teste de QuantiFERON® TG-Gold In-Tube (Cellestis, Carnegie, Austrália), em que o sangue integral é extraído diretamente em tubos vacutainer pré-revestidos com solução salina (nula), antígenos de peptídeos específicos de TB (AG), ou mitógeno 5 (PHA). Os tubos foram incubados em uma realização atualmente preferida em 18 horas a 37°C, onde em seguida a concentração de citocina foi medida pela tecnologia de xMAP na plataforma de Luminex (Luminex Corporation, EUA), ao utilizar reagentes Biosource (Biosource Camarillo EUA), e desse modo foi 10 possível comutar o parâmetro de efeito do parâmetro tradicional IFN- γ para IP-10, que é expresso em concentrações mais elevadas e tem um melhor desempenho.

A elevada sensibilidade da presente invenção faz deste método uma excelente ferramenta para a diferenciação 15 entre a infecção ativa, a infecção latente, a infecção recente, a infecção em uma criança/um recém-nascido e/ou a infecção latente de longa duração. Desse modo, em uma realização, a presente invenção refere-se a um método em que uma resposta a IP-10 dependente de antígeno acima do nível de 20 referência junto com um valor Nil indica que o mamífero tem uma infecção ativa, uma infecção latente, uma infecção recente, e/ou uma infecção latente de longa duração.

Em uma outra realização, a presente invenção refere-se a um método onde a quantidade de material de 25 amostra (por exemplo, sangue integral) utilizada no teste é reduzida. No caso do sangue integral para baixo até a faixa de 3 a 0,1 ml, e no caso de PBMCs o número de células fica na faixa de 1×10^6 a $0,05 \times 10^6$. Este "mini-ensaio" apropriado para pacientes com baixo volume de sangue (especialmente 30 crianças/bebês ou pacientes com anemia) é inovador, uma vez que ele pode diagnosticar uma doença (por exemplo, a tuberculose) sem conseqüências hemodinâmicas para o doador, ou ser executado em um material de amostra muito escasso, por

exemplo, células de fluido espinhal, de fluido pleural ou sangue do cordão umbilical.

Combinação com outros marcadores

5 A medição de IP-10 em combinação com um ou mais dos seguintes marcadores podem reduzir o número de falsos positivos e aumentar o poder discriminatório. Desse modo, em uma realização, o método compreende adicionalmente:

- 10 a) a determinação do nível de IP-10 e de MCP-1 em resposta à estimulação antigênica,
- b) a combinando do nível determinado de IP-10 e de MCP-1, e
- c) a comparação do dito nível combinado com um nível de referência combinado.

15 Conforme compreendido pelo elemento versado na técnica, o nível de referência combinado é determinado ao medir o nível de IP-10 e qualquer um dos marcadores combinatoriais sugeridos tais como, mas sem ficar a eles limitados, o nível de MCP-1 em uma população saudável e a combinação do dito nível de IP-10 e MCP-1 determinado por 20 meio de aritmética tal como, mas sem ficar a ela limitada, a adição. O nível de referência combinado é determinado em um ponto de corte selecionado relacionado à distribuição do nível de referência combinado, por exemplo, a média mais dois desvios padrão em uma população saudável ou por outros meios 25 conhecidos de um elemento versado na técnica.

Outros marcadores combinatoriais compreendem IL-2 e INF- γ .

Em uma realização, a presente invenção apresenta um método que compreende adicionalmente:

- 30 a) a determinação do nível de INF- γ e opcionalmente de MCP-1 e/ou IL-2 em resposta à estimulação antigênica,

b) a combinando do nível determinado de IP-10 e de INF- γ e opcionalmente de MCP-1 e/ou IL-2, e

c) a comparação do dito nível combinado com um nível de referência combinado.

5 Em uma realização, o método compreende:

a) a determinação do nível de IP-10 em resposta à estimulação antigênica,

b) a comparação do nível de IP-10 a um nível de referência ou um valor derivado do mesmo,

10 c) a determinação se o dito mamífero encontrou previamente o dito antígeno e gerou desse modo a reatividade de IP-10 ao antígeno,

d) a determinação do nível de MCP-1 em resposta à estimulação antigênica,

15 e) a comparação do nível de MCP-1 a um nível de referência ou um valor derivado do mesmo,

f) a determinação se o dito mamífero encontrou previamente o dito antígeno e desse modo gerando a reatividade de MCP-1 ao antígeno,

20 g) a combinação da reatividade de IP-10 determinada e a reatividade de MCP-1,

determinando desse modo se o mamífero encontrou previamente o antígeno e gerou desse modo a reatividade imunológica ao antígeno com pelo menos um biomarcador.

25 Em uma realização, o método compreende:

a) a determinação do nível de IP-10 em resposta à estimulação antigênica,

b) a comparação do nível de IP-10 a um nível de referência ou um valor derivado do mesmo,

30 c) a determinação se o dito mamífero encontrou previamente o dito antígeno e desse modo gerando a reatividade de IP-10 ao antígeno,

d) a determinação do nível de IL-2 em resposta à estimulação antigênica,

e) a comparação do nível de IL-2 a um nível de referência ou um valor derivado do mesmo,

5 f) a determinação se o dito mamífero encontrou previamente o dito antígeno e desse modo gerando a reatividade de IL-2 ao antígeno,

g) a combinação da reatividade de IP-10 determinada e a reatividade de IL-2, desse modo determinando se o
10 mamífero encontrou previamente o antígeno e desse modo gerando a reatividade imunológica ao antígeno com pelo menos um biomarcador.

Em uma realização, o método compreende:

15 a) a determinação do nível de IP-10 em resposta à estimulação antigênica,

b) a comparação do nível de IP-10 a um nível de referência ou um valor derivado do mesmo,

20 c) a determinação se o dito mamífero encontrou previamente o dito antígeno e desse modo gerando a reatividade de IP-10 ao antígeno,

d) a determinando do nível de IFN- γ em resposta à estimulação antigênica,

e) a comparação do nível de IFN- γ a um nível de referência ou um valor derivado do mesmo,

25 f) a determinação se o dito mamífero encontrou previamente o dito antígeno e desse modo gerando a reatividade de IFN- γ ao antígeno,

g) a combinação da reatividade de IP-10 determinada e a reatividade de IFN- γ ,

30 desse modo determinando se o mamífero encontrou previamente o antígeno e desse modo gerando a reatividade imunológica ao antígeno com pelo menos um biomarcador.

Em uma realização, o método compreende:

a) a determinação do nível de IP-10 em resposta à estimulação antigênica,

b) a comparação do nível de IP-10 a um nível de referênci
5 a ou um valor derivado do mesmo,

c) a determinação se o dito mamífero encontrou previamente o dito antígeno e desse modo gerando a reatividade de IP-10 ao antígeno,

d) a determinação do nível de INF- γ e/ou MCP-1 e/ou IL-2 em resposta à estimulação antigênica,
10

e) a comparação do nível de INF- γ e/ou MCP-1 e/ou IL-2 aos níveis de referênci
a para cada biomarcador ou valores derivados do mesmo,

f) a determinação se o dito mamífero encontrou previamente o dito antígeno e desse modo gerando a reatividade de INF- γ e/ou MCP-1 e/ou IL-2 ao antígeno,
15

g) a combinação da reatividade de IP-10 determinada e/ou a reatividade de INF- γ e/ou MCP-1 e/ou IL-2,

desse modo determinando se o mamífero encontrou previamente o antígeno e desse modo gerando a reatividade imunológica ao antígeno com pelo menos um dos biomarcadores examinados.
20

Diagnóstico

Em uma realização, e tal como indicado previamente, o IP-10 pode ser utilizado para o diagnóstico dos indivíduos com suspeita de vários estados imunológicos, tais como infecções. Quando utilizado no diagnóstico, o método de acordo com a presente invenção pode ajudar na determinação da presença de estados imunológicos, tais como as infecções, geralmente efetuada ao avaliar os sintomas clínicos e outros testes de laboratório. O teste pode diagnosticar vários estágios da infecção, isto é, uma infecção recentemente
25
30

encontrada em um indivíduo sem nenhum sintoma, uma infecção encontrada há muitos anos atrás em um indivíduo sem nenhum sintoma dessa infecção, uma infecção ativa onde os pacientes têm sintomas devido à infecção.

5 Em uma outra realização, o IP-10 pode ser utilizado para o diagnóstico dos indivíduos com suspeita de infecção de tuberculose (por exemplo, infecção de TB ativa, latente ou recente) e em pacientes particulares com um risco aumentado para a progressão de tuberculose latente para ativa, isto é, 10 pacientes que recebem medicação imunossupressora (isto é, tratamento com anticorpos monoclonais) (anticorpos anti-CD20 (por exemplo, Rituximab[®]) ou tratamento de bloqueio de TNF- α (por exemplo, Remicade[®], Enbrel[®], Humira[®])) ou esteróides ou quimioterapia de câncer; ou pacientes sofrendo de condições 15 imunossupressoras (por exemplo, infecção por HIV, câncer, IDDM ou diabetes mellitus não dependente de insulina (NIDDM), condição autoimunológica, desnutrição, idade avançada, uso de drogas intravenosas (IVDU) ou distúrbios imunológicos herdados), e em indivíduos recentemente infectados. 20 Realmente, seguindo as diretrizes padrão estes pacientes devem ser selecionados para TB ativa, latente ou recente antes de ser iniciado o tratamento médico.

 Atualmente, é altamente recomendável selecionar os 25 pacientes que são candidatos para o tratamento de bloqueador de TNF- α ou que são HIV positivos com teste de TST ou de IFN- γ específico de antígeno de M. tuberculosis IFN- γ . Conforme os estudos demonstraram, estes testes podem não ser confiáveis nas categorias de pacientes acima mencionadas em que o IP-10 é um melhor candidato devido à sua sensibilidade 30 mais elevada.

 Em uma outra realização, o IP-10 pode ser utilizado para selecionar os indivíduos com suspeita de infecção por

Chlamydia (por exemplo, infecção uro-genital, infecção pélvica e/ou infecção nos olhos).

A presente invenção permite a combinação de antígenos de vários agentes infecciosos que colonizam o mesmo
5 órgão ou a região anatômica, ou então geram um grupo comum de sintomas. Com a combinação de antígenos específicos diferentes, pode ser possível selecionar pacientes de risco, ou excluir os patógenos comuns que geram condições clínicas indistinguíveis, tal como a infecção uro-genital; ou são
10 suscetíveis ao mesmo tratamento, por exemplo, com antibióticos.

Desse modo, em uma realização, a presente invenção refere-se a um método para selecionar simultaneamente pelo menos duas doenças infecciosas, o qual compreende:

15 a) a obtenção de uma amostra de um paciente com necessidade do mesmo, e a divisão da dita amostra em pelo menos duas frações,

b) a estimulação de uma fração com antígenos, em que os ditos antígenos são relacionados ao(s) agente(s)
20 infeccioso(s) específico(s) selecionado(s) para a avaliação (fração de resposta) ao incubar a segunda fração de amostra com uma solução inativa (fração Nil),

c) a medição do nível de IP-10 em ambas as frações,

d) a determinação do nível de IP-10 dependente de
25 antígeno da amostra ao subtrair o nível de IP-10 determinado na fração Nil do IP-10 determinado da fração de resposta,

e) a comparação do dito nível de IP-10 dependente de antígeno determinado a um nível de referência para pelo menos um dos agentes infecciosos selecionados, e

30 f) a referência ao dito paciente com necessidade do mesmo como infectado com pelo menos um dos agentes infecciosos selecionados se o nível de IP-10 dependente de

antígeno for mais elevado do que o nível de IP-10 na fração de referência.

Consequentemente, os métodos da presente invenção podem ser aplicáveis para a seleção de pessoas com risco elevado de doenças infecciosas, por exemplo, pessoas que permaneceram ou viajaram através de áreas endêmicas de doenças.

Desse modo, em uma realização da presente invenção, as doenças infecciosas são selecionadas do grupo que consiste em malária, tuberculose, meningite, encefalite japonesa, cólera, leishmanina, dengue e poliomielite.

Em uma outra realização da invenção, as doenças infecciosas são selecionadas das doenças sexualmente transmitidas que consistem em cancro, infecção por Chlamydia, gonorréia, Lymphogranuloma venereum, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Treponema pallidum, Hepatite B, vírus de Herpes simplex, Vírus de Imunodeficiência Humana, papillomavirus humano, Phthirius pubis, Sarcoptes scabiei e Trichomonas vaginalis.

Em ainda uma realização da invenção, as doenças infecciosas são selecionadas do grupo que consiste em agentes infecciosos gastro-intestinais tratáveis, por exemplo, Shigella, E. Coli, Campylobactor, bactérias de Vibrio cholerae, Cryptosporidium parvum, Salmonella bacteri e bactérias Salmonella typhi.

Em ainda uma realização da invenção, as doenças infecciosas são selecionadas do grupo que consiste em agentes infecciosos gastro-intestinais não tratáveis com antibióticos, por exemplo, rotavirus, norovirus, adenovirus, sapoviruses e astrovirus.

Em uma realização adicional da invenção, as doenças infecciosas são selecionadas do grupo que consiste em doenças relacionadas ao sangue grupo que são sujeitas à seleção, por

exemplo, em bancos de sangue: Hepatite A, Hepatite E, malária, doença de Chagas, Babesiose, Leishmaniase, vírus espumante de símios, mal de Creutzfeldt-Jacob (vCJD), mal de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Cytomegalovirus (CMV) e vírus de
5 Epstein-Barr.

Em uma realização da invenção, as doenças infecciosas são selecionadas do grupo que consiste em bactérias que podem causar meningite bacteriana, Neisseria meningitides, Streptococcus pneumoniae, Listeria
10 monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae e Haemophilus influenza.

Consequentemente, o objetivo da presente invenção consiste em fazer o diagnóstico de uma espécie específica, porque a seleção de um antígeno específico permite que o
15 elemento versado na técnica diferencie entre várias espécies, por exemplo, de Mycobacterium.

Prognóstico

Em uma realização, o IP-10 pode ser utilizado para prever o prognóstico dos indivíduos diagnosticados com
20 vários estados imunológicos, tais como infecções. Quando utilizado no prognóstico de pacientes, o método de acordo com a presente invenção pode ajudar a prever o curso e o resultado provável de estados imunológicos, tais como as infecções, ajudando desse modo o elemento versado na técnica
25 a selecionar o método de tratamento apropriado e a prever o efeito de um determinado tratamento para a condição.

Monitoramento

Em uma realização, o IP-10 pode ser utilizado para monitorar os indivíduos diagnosticados com infecções. Quando
30 utilizado no monitoramento de pacientes, o método de acordo com a presente invenção pode ajudar a avaliar a eficácia do tratamento durante e após a conclusão do tratamento, por

exemplo, o monitoramento e a previsão de possível recorrência da infecção.

A possibilidade de monitorar a eficácia da terapia pela presente invenção é particularmente relevante porque
5 (utilizando a infecção com *M. tuberculosis* como um exemplo):

a) é fácil de executar por uma simples extração de sangue em vez dos métodos atualmente disponíveis tais como a microscopia de esputo, a cultura de *mycobacterium*, raios X ou outros métodos,

10 b) é mais reproduzível em comparação à microscopia de esputo, à cultura de *mycobacterium*, aos raios X ou a outros métodos,

c) é barata em comparação com a microscopia de esputo, a cultura de *mycobacterium*, os raios X ou outros
15 métodos, procedimentos cirúrgicos invasivos envolvidos em uma biópsia, por exemplo, se houver a suspeita de uma tuberculose extra-pulmonar, ou uma broncoscopia, se o paciente for esputo negativo,

d) é mais sensível em comparação aos ensaios de
20 IFN- γ para a tuberculose com base nos peptídeos de sobreposição de RD1;

e) pode distinguir entre tuberculose ativa e latente enquanto os outros imunoenaios só distinguem a infecção ou nenhuma infecção.

25 Seleção

Em uma realização, o método de acordo com a presente invenção é utilizado para finalidades de seleção. Isto é, ele é utilizado para a avaliação de indivíduos sem um diagnóstico prévio de infecções mediante a medição do nível
30 de IP-10 de acordo com a invenção e a correlação do nível medido com um nível previamente especificado, indicando a presença ou a ausência de várias infecções (por exemplo, a infecção com *M. tuberculosis*). Em uma outra realização, o

método de acordo com a presente invenção é utilizado para finalidades de seleção. Isto é, ele é utilizado para a avaliação de indivíduos sem um diagnóstico prévio das infecções mas com risco de reativação da doença latente mediante a medição do nível de IP-10 de acordo com um nível previamente especificado que indica a invenção e que correlaciona o nível medido com a presença ou a ausência de várias infecções (por exemplo, a infecção com M. tuberculosis).

10 Conforme indicado previamente, a presente invenção apresenta um método para selecionar simultaneamente pelo menos duas doenças infecciosas.

Em uma outra realização da presente invenção, o método pode ser utilizado para selecionar o sangue de doadores de sangue quanto a várias doenças tais como, mas sem ficar a elas limitadas, infecção(ões) causada(s), por exemplo, por parasitas ou vírus.

Traçado de contato

Nas realizações preferidas, o IP-10 pode ser utilizado para o diagnóstico dos indivíduos expostos a várias infecções, tal como com M. tuberculosis. Quando utilizado no traçado de contato, o método de acordo com a presente invenção pode ajudar na determinação da presença de infecções, tal como a infecção com M. tuberculosis.

25 Em outras realizações, o IP-10 pode ser utilizado para o diagnóstico dos indivíduos expostos aos casos contagiosos na eclosão de infecções altamente contagiosas tais como, mas sem ficar a eles limitadas, a tuberculose, vírus de Corona (por exemplo, Síndrome Respiratória Adquirida Grave), Influenza, Ébola ou vírus de Marburg. No caso da tuberculose: Quando utilizado em traçado de contato, o método de acordo com a presente invenção pode ajudar na determinação da presença da infecção, realizada geralmente efetuada ao

30

avaliar o TST ou o ensaio de liberação de IFN- γ atualmente disponível.

Descoberta de caso realçado

Nas realizações preferidas, o IP-10 pode ser
5 utilizado para o diagnóstico de várias doenças, tais como
infecções. Quando utilizado na descoberta de caso realçado, o
método de acordo com a presente invenção pode ajudar na
determinação da presença de infecções, tais como, mas sem
ficar a elas limitada, a TB negativa em microscopia que de
10 outra maneira é difícil de diagnosticar devido à falta da
evidência microbiológica da infecção mas que é geralmente
efetuada ao avaliar os sintomas clínicos, a resposta ao
tratamento, e a falta de diagnósticos alternativos, ou por
ensaios demorados (semanas) como a cultura de esputo.

15 Estudos de predominância

Nas realizações preferidas, o IP-10 pode ser
utilizado para estudar a predominância de vários estados
imunológicos, tais como, mas sem ficar a eles limitados,
infecções nas populações de interesse tais como crianças,
20 imigrantes HIV positivos, refugiados, trabalhadores da área
da saúde, crianças em idade escolar, prisioneiros, técnicos
de laboratório. Quando utilizado em estudos de predominância,
o método de acordo com a presente invenção pode ajudar na
determinação da presença de uma infecção, tal como TB latente
25 e ativa em uma população, geralmente efetuada por TST.

Finalidades da pesquisa

Em uma realização, o IP-10 pode ser utilizado por
instituições de pesquisa quando da seleção quanto a novos
antígenos potenciais derivados de um microorganismo
30 selecionado do grupo que consiste em mycobacteria, bactérias
gram-positivas, bactérias gram-negativas, Listeria,
enterococci, Neisseria, vibrio, treponema (sífilis),
Borrelia, leptospirae, Clamydia, retrovírus (SIV, HIV-1 e

HIV-2), vírus de corona tais como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e NL-63, Cytomegalovirus, rotavirus, metapneumovirus, vírus de syncytium respiratório (RSV), poxvirus, vírus de Ebstein barr, enterovirus, morbilivirus, 5 rabdovirus (raiva), Rubivirus (rubéola), flavivirus (dengue, febre amarela), vírus de herpes, vírus de varicellea-zoster, hepatite C e B, Leishmania, Toxoplasma gondii, trypanosoma, Plasmodium (falciparum, vivax, ovale, malária), pneumocystis cariini (PCP) e vários nematódeos, trematódeos, e estes 10 antígenos podem ser, por exemplo, lipídios, moléculas de polissacarídeos, proteínas e peptídeos. Quando utilizado para finalidades de pesquisa de laboratório, o método de acordo com a presente invenção podem ajudar na determinação da imunoreatividade ao antígeno, à proteína ou ao peptídeo 15 examinado aplicável no desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico.

Diversas moléculas de antígeno tais como, por exemplo, peptídeos, são identificadas como específica de espécie ou específica de doença, mas a sua capacidade de 20 induzir a reatividade das células T in vivo é difícil de determinar devido a uma falta de marcadores sensíveis. O IP-10 determinado depois da estimulação com tais antígenos candidatos pode ser utilizado para selecionar e para identificar novos antígenos ou moléculas potencialmente 25 interessantes. Mais especificamente no caso dos antígenos derivados de M. tuberculosis, C. trachomatis, HIV-1 ou HCV, o IP-10 pode ser utilizado por instituições de pesquisa quando testando a imunogenicidade destes antígenos, isto é, como uma medida da reatividade das células T para o desenvolvimento, 30 por exemplo, de vacinas.

Efeito do tratamento

Os autores da presente invenção propõem que os testes repetidos da liberação espontânea durante a incubação

(amostra Nil) e IP-10 induzido por antígeno (amostra de Ag) durante o tratamento podem ser utilizados como marcadores para o efeito do tratamento. Se as respostas de IP-10 espontâneas declinarem durante o tratamento, isto pode ser considerado bem sucedida, ao passo que, se nenhum declínio for observado, então deve haver a suspeita de uma falha de tratamento.

Os autores da presente invenção propõem que os testes repetidos de IP-10 espontâneo e induzido por antígeno durante, por exemplo, o tratamento de TB podem ser utilizados como marcador para o efeito do tratamento. Se as respostas ao IP-10 estimulado por antígeno diminuem durante o tratamento, isto pode ser considerado bem sucedido, ao passo que se nenhuma diminuição for observada deve haver a suspeita de uma falha do tratamento.

Deve ser compreendido que qualquer característica e/ou aspecto aqui discutidos em relação à determinação de acordo com a invenção se aplicam por analogia ao "diagnóstico", "prognóstico", "monitoramento", "seleção", "finalidades de pesquisa", "traçado de contato", "descoberta de caso realçado" e "estudos de predominância" de acordo com a invenção, e vice-versa.

Etapa de incubação

As células do sistema de CMI perdem a capacidade de montar uma resposta a CMI no sangue integral após os períodos prolongados que seguem a extração de sangue do indivíduo, e as respostas sem intervenção são frequentemente reduzidas intensamente ou ausentes 24 horas depois da extração de sangue, se não forem tratadas de uma maneira que prolongue a vida das células tais como, mas sem ficar a ela limitada, a preservação a uma temperatura acima de 10° Celsius.

Em uma realização, a redução do trabalho permite que a estimulação da amostra com antígenos seja executada no

ponto de locais de cuidados tais como consultórios médicos, clínicas, instalações de pacientes em ambulatório e clínicas veterinárias ou em fazendas. Uma vez que a estimulação do antígeno esteja completa, o requisito para células frescas e
5 ativas não existe mais. O IP-10 e outros biomarcadores tais como citocinas ou moléculas de imunofatores são estáveis no plasma e, desse modo, a amostra pode ser armazenada, congelada ou transportada sem condições especiais ou requisitos de tempo rápido de uma forma similar às amostras
10 padrão de plasma utilizadas para outras doenças infecciosas ou um outro diagnóstico da doença.

A etapa de incubação pode durar de 5 a 144 horas, mais preferivelmente de 5 a 120 horas, e ainda mais preferivelmente de 12 a 24 horas, ou um período de tempo
15 intermediário. Desse modo, em uma realização da presente invenção, a duração da incubação é de 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 26
20 horas, 30 horas, 36 horas, 42 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, ou 144 horas.

Devido ao fato que o IP-10 é secretado em tais concentrações elevadas, é possível incubar as amostras fora da incubadora, isto é, na mesa no laboratório ou em um banho
25 de água com temperatura estável ou em um dispositivo de carregar transportável. Isto pode ser especialmente útil em países em desenvolvimento ou em clínicas de pacientes em ambulatório com instalações básicas de laboratório.

A etapa de incubação pode ocorrer a uma temperatura
30 que varia de 20° a 43° Celsius. Desse modo, em uma realização da presente invenção, a temperatura da incubação pode ser de 16° Celsius, 18° Celsius, 20° Celsius, 22° Celsius, 25° Celsius, 26° Celsius, 27° Celsius, 28° Celsius, 29° Celsius,

30° Celsius, 31° Celsius, 32° Celsius, 33° Celsius, 35° Celsius, 37° Celsius, 38° Celsius, 39° Celsius, 40° Celsius ou 41° Celsius.

5 A etapa de incubação pode ser executada a uma temperatura não fixa entre, mas não aí limitada, 15° e 40° Celsius, mais preferivelmente 18° e 37° Celsius, e ainda mais preferivelmente 30 e 37° Celsius.

10 Uma realização da invenção permite que a estimulação da amostra em diluição seja executada, isto com a adição de meios de cultura à cultura das células.

Uma outra realização da invenção permite que a estimulação da amostra seja executada com a adição de líquido de diluição inerte (por exemplo, solução salina) à cultura das células.

15 Amostra

Uma realização da presente invenção contempla um método para medir uma resposta de CMI em um indivíduo, em que o dito método compreende a coleta de uma amostra do dito indivíduo, sendo que a dita amostra compreende célula do sistema imunológico, as quais têm a capacidade de produzir moléculas de imunofetor depois da estimulação por um antígeno, a incubação da dita amostra com um antígeno e então a medição da presença ou elevação do nível de uma molécula de imunofetor em que a presença ou o nível da dita molécula de imunofetor é indicativa da capacidade do dito indivíduo montar uma imunoresposta mediada por células.

20

25

Em uma realização, a amostra é derivada do grupo que consiste em sangue, urina, fluido pleural, fluido bronquial, lavagens orais, biópsias de tecidos, ascites, pus, fluido cerebrospinal, aspirados e fluido folicular.

30

Em uma realização preferida, a amostra é derivada do sangue.

A amostra também pode, no entanto, compreender as células selecionadas do grupo que consiste em sangue integral, células mononucleares do fluido pleural, células mononucleares do sangue periférico (PBMC's), células T, células CD4 T, células CD8 T, células gama-delta T, monócitos, macrófagos e células NK.

Convenientemente, quando a amostra é o sangue integral, o tubo de coleta de sangue é tratado com um anticoagulante (por exemplo, a heparina). Apesar do fato que esse sangue integral é a amostra preferida e mais conveniente, a presente invenção se estende a outras amostras que contêm imunocélulas tais como, mas sem ficar a eles limitadas, fluido pleural, fluido de ascites, fluido linfático, fluido espinal ou cerebral, fluido de tecidos e fluido respiratório incluindo o fluido nasal, e fluido pulmonar.

Em uma realização, a presente invenção refere-se desse modo a um método, em que a amostra é derivada do sangue, da urina, de fluido pleural, de fluido bronquial, de lavagens orais, de biópsias de tecidos, do líquido de ascites, de pus, de fluido cerebrospinal, de aspirados, e/ou de fluido folicular.

Em uma outra realização, a presente invenção refere-se desse modo a um método, em que a amostra compreende as células selecionadas do grupo que consiste em células mononucleares periféricas, células T, células CD4 T, células CD8 T, células gama-delta T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células NK.

Em uma realização, a amostra é o sangue integral, o qual pode ser coletado em três recipientes apropriados em que o antígeno, o mitógeno ou "nulo" está presente. Em uma outra realização, os antígenos, o mitógeno ou o "nulo" podem ser

adicionados às alíquotas que contêm a amostra, por exemplo, o sangue integral, posteriormente.

Em uma outra realização, a amostra é o sangue integral que pode ser coletado nos tubos de coleta que contêm o antígeno, o mitógeno ou o "nulo" ou as alíquotas de sangue integral às quais o antígeno, o mitógeno ou o Nil é adicionado.

Geralmente, o sangue é mantido na presença de um anticoagulante (preferivelmente a heparina, alternativamente, por exemplo, citrato ou EDTA). O anticoagulante está presente no tubo de coleta de sangue quando o sangue é adicionado. O uso dos tubos de coleta de sangue é preferivelmente, mas não necessariamente, compatível com os sistemas de laboratório automatizados padrão e estes são suscetíveis à análise na amostragem em larga escala e com acesso aleatório. Os tubos de coleta de sangue também minimizam os custos de manipulação e reduzem a exposição do laboratório ao sangue integral e ao plasma e, desse modo, reduzem o risco do pessoal do laboratório de contrair um agente patogênico tal como, mas sem ficar a ele limitado, o vírus de imunodeficiência humana.

As alíquotas do sangue integral pode estar em volumes que variam de 10 μl - 4000 μl , tais como, mas não limitados a 50 μl , 100 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl , 500 μl , 600 μl , 700 μl , 800 μl , 900 μl , 1000 μl , 1100 μl , 1200 μl , 1300 μl , 1400 μl , 15, 1600 μl , 1700 μl , 1800 μl , 1900 μl , 2000 μl , 2100 μl , 22, 23, 2400 μl , 2500 μl , 2600 μl , 2700 μl , 2800 μl , 2900 μl ou 3000 μl .

A amostra pode ser incubada em tubos, cavidades de cultura de tecido ou outros recipientes, e o antígeno, o mitógeno e o "nulo" podem ser adicionados em concentrações relevantes.

Um tubo de coleta de sangue inclui um vacutainer-tubo ou um outro vaso similar, mas o sangue também pode ser extraído diretamente em um tubo aberto ou um tubo capilar.

Kit

5 A presente invenção contempla adicionalmente um kit para avaliar a capacidade de um indivíduo montar uma resposta mediada por células. O kit se apresenta convenientemente na forma de compartimentos com um ou mais compartimentos adaptados para receber uma amostra de um indivíduo tal como
10 célula de sangue integral purificada, biópsias ou um outro material. Esse compartimento ou um outro compartimento também pode ser adaptado para conter a heparina onde a amostra é o sangue integral.

 Geralmente, o kit se apresenta em uma forma que é
15 acondicionada para a venda com um conjunto de instruções. As instruções deve estar geralmente na forma de um método para medir uma resposta de CMI em um indivíduo, em que o dito método que compreende a coleta de uma amostra do dito indivíduo, sendo que a dita amostra compreende células do
20 sistema imunológico, as quais têm a capacidade de produzir moléculas de imunofetor depois da estimulação por um antígeno, a incubação da dita amostra com um antígeno fornecido com o kit e então a medição da presença ou elevação no nível de IP-10, em que a presença ou o nível da dita
25 molécula de imunofetor é indicativo da capacidade do dito indivíduo montar uma imunoresposta mediada por células.

 Em uma realização, o kit contém o antígeno e anticorpos monoclonais ou policlonais, que está reagindo especificamente com o IP-10 em um immunoensaio, ou fragmentos
30 de ligação específicos dos ditos anticorpos para o uso como um reagente de diagnóstico.

 O kit contemplado da presente invenção pode estar em uma forma de múltiplos componentes em que um primeiro

componente compreende uma multiplicidade de tubos de coleta de sangue, um segundo componente que compreende um meio de detecção à base de anticorpo para uma molécula de imunofetor e um terceiro componente que compreende um conjunto de instruções em que as instruções compreendem o seguinte: (i) coletar o sangue nos tubos de coleta de sangue; (ii) misturar os tubos; (iii) incubar os tubos; (iv) centrifugar os tubos e coletar o plasma; e (v) detectar as moléculas de imunofetor no plasma.

10 O ensaio também pode ser automatizado ou semi-automatizado e os aspectos automatizados podem ser controlados por um software de computador.

O ensaio da presente invenção pode ser automatizado ou semi-automatizado para a seleção elevada do resultado ou para selecionar um número de imunofetores de um indivíduo. A automatização é controlada convenientemente pelo software de computador. A presente invenção contempla um produto de programa de computador, portanto, para avaliar a presença ou a ausência ou o nível de IP-10, e o dito produto compreende:

20 (1) um código que recebe, como valores de entrada, a identidade de uma molécula repórter associada com um anticorpo ou mRNA etiquetado,

(2) um código que compara os ditos valores de entrada com os valores de referência para determinar o nível e/ou das moléculas repórter e/ou a identidade da molécula à qual a molécula repórter é unida; e

(3) uma mídia que pode ser lida por computador que armazena os códigos.

Ainda um outro aspecto da presente invenção se estende um computador para avaliar a presença ou a ausência ou o nível de IP-10, em que o dito computador compreende:

(1) uma mídia de armazenamento de dados que pode ser lida por máquina que compõe um material de armazenamento

de dados codificado com dados que podem ser lidos por máquina, em que os ditos dados que podem ser lidos por máquina compreendem valores de entrada que identificam uma molécula repórter associada com um anticorpo ou mRNA etiquetado;

(2) uma memória operacional para armazenar as instruções para processar os ditos dados que podem ser lidos por máquina,

(3) uma unidade central de processamento acoplada à dita memória operacional e à dita mídia de armazenamento de dados que pode ser lida por máquina, para processar os ditos dados que podem ser lidos por máquina para comparas os ditos valores para fornecer uma avaliação da identidade ou nível de moléculas repórter ou das moléculas às quais são unidas; e

(4) um hardware de saída acoplou à dita unidade central de processamento, para receber os resultados da comparação.

Especificidade e sensibilidade

A sensibilidade de qualquer teste de diagnóstico define a proporção dos indivíduos com uma resposta positiva que são identificados corretamente ou diagnosticados pelo teste, por exemplo, a sensibilidade é 100% se todos os indivíduos com uma determinada condição tiverem um teste positivo. A especificidade de um determinado teste de seleção reflete a proporção dos indivíduos sem a condição que são corretamente identificados ou diagnosticados pelo teste, por exemplo, 100% de especificidade se todos os indivíduos sem a condição tiverem um resultado de teste negativo.

A sensibilidade é definida como a proporção dos indivíduos com uma determinada condição (por exemplo, infecção ativa de TB), que são identificados corretamente pelos métodos descritos da invenção (por exemplo, tem um resultado de teste IP-10 positivo).

A especificidade neste caso é definida como a proporção dos indivíduos sem a condição (por exemplo, infecção ativa de TB), que são identificados corretamente pelos métodos descritos da invenção (por exemplo, tem um resultado de teste IP-10 negativo).

Características de operação de receptor

A exatidão de um teste de diagnóstico é mais bem descrita pelas suas características de operação de receptor (ROC) (vide especialmente Zweig, M. H., and Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). O gráfico de ROC é uma curva de todos os pares de sensibilidade/especificidade resultantes da variação contínua do limite de decisão por toda a gama de dados observados.

O desempenho clínico de um teste de laboratório depende de sua exatidão de diagnóstico, ou da capacidade de classificar corretamente os indivíduos em subgrupos clinicamente relevantes. A exatidão de diagnóstico mede a capacidade do teste de distinguir corretamente duas condições diferentes dos indivíduos investigados. Tais condições incluem, por exemplo, a saúde e a doença, a infecção latente ou recente versus nenhuma infecção, ou a doença benigna versus a doença maligna.

Em cada caso, o gráfico de ROC ilustra a sobreposição entre as duas distribuições ao traçar a sensibilidade versus a especificidade 1 para a faixa completa de limites de decisão. No eixo y estão a sensibilidade, ou a fração verdadeiro-positiva [definida como $(\text{número de resultados de teste verdadeiro-positivos}) / (\text{número de resultados de teste verdadeiro-positivo} + \text{número de resultados de teste falso-negativos})$]. Isto também é indicado como positividade na presença de um uma doença ou condição. Só é calculado a partir do subgrupo afetado. No eixo x é a fração falso-positiva, ou $1 - \text{especificidade}$ [definida como

(número de resultados falso-positivos/(número de resultados verdadeiro-negativos + número de resultados falso-positivos)]. É um índice da especificidade e é calculado inteiramente a partir do subgrupo não afetado.

5 Devido ao fato que as frações verdadeiro- e falso-positivas são calculadas de uma maneira inteiramente separada, ao utilizar os resultados de teste de dois subgrupos diferentes, o gráfico de ROC é independente da predominância da doença na amostra. Cada ponto no gráfico de
10 ROC representa um par de sensibilidade/especificidade que corresponde a um limite de decisão particular. Um teste com discriminação perfeita (nenhuma sobreposição nas duas distribuições dos resultados) tem um gráfico de ROC que passa através do canto esquerdo superior, onde a fração verdadeira-
15 positiva é 1,0, ou 100% (sensibilidade perfeita), e a fração falsa-positiva é 0 (especificidade perfeita). O gráfico teórico para um teste sem nenhuma discriminação (distribuições idênticas dos resultados para os dois grupos) é uma linha diagonal de 45 graus do canto esquerdo inferior
20 ao canto direito superior. A maioria dos gráficos se enquadra entre estes dois extremos. (Se o gráfico de ROC cair completamente abaixo da diagonal de 45 graus, isto é remediado facilmente ao inverter o critério para a "positividade" de "maior do que" para "menor do que" ou vice-
25 versa). Qualitativamente, quanto mais próximo o gráfico estiver do canto esquerdo superior, mais elevada a exatidão total do teste.

Um objetivo conveniente para quantificar a exatidão de diagnóstico de um teste de laboratório é a expressão do
30 seu desempenho por um único número. A medida global mais comum é a área sob o gráfico de ROC. Por convenção, esta área é sempre $> 0,5$ (se não for, é possível inverter a regra de decisão para que seja). Os valores variam entre 1,0

(separação perfeita dos valores de teste dos dois grupos) e 0,5 (nenhuma diferença distribucional aparente entre os dois grupos de valores de teste). A área não depende somente de uma parte particular do gráfico tal como o ponto mais próximo à diagonal ou a sensibilidade a uma especificidade de 90%, mas do gráfico inteiro. Esta é uma expressão descritiva quantitativa de quão próximo o gráfico de ROC é da perfeição (área = 1,0).

A utilidade clínica do novo marcador IP-10 pode ser avaliada em comparação com e em combinação com outras ferramentas de diagnóstico para a infecção em questão. No caso da infecção com *M. tuberculosis*, a utilidade clínica do novo marcador de IP-10 pode ser avaliada em comparação com ferramentas de diagnóstico estabelecidas, o marcador de IFN- γ estabelecido ou o TST ao utilizar uma análise da curva de operação do receptor. Vide os exemplos 5.

Desse modo, um objetivo das realizações preferidas da presente invenção consiste na apresentação de um método imunológico para detectar se um mamífero encontrou um antígeno, em que o método compreende:

a) a determinação do nível de produção de IP-10 específico de antígeno em uma amostra do dito mamífero,

b) a construção de um gráfico percentual do nível de IP-10 obtido de uma população saudável,

c) a construção de uma curva de ROC (características de operação do receptor) baseada no nível de IP-10 determinado na população saudável e no nível de IP-10 determinado em uma população que gerou a reatividade imunológica para o antígeno em questão,

d) a seleção de uma especificidade desejado,

e) a determinação, a partir da curva de ROC, da sensibilidade que corresponde à especificidade desejada,

f) a determinação do gráfico percentual do nível de IP-10 que corresponde à sensibilidade determinada; e

g) a predição do indivíduo para ter o reatividade imunológica ao antígeno, se o nível de IP-10 na amostra for igual ou maior do que o nível de IP-10 que corresponde à especificidade determinada e a predição do indivíduo como improvável ou não de ter a reatividade imunológica ao antígeno se o nível de IP-10 na amostra for mais baixo do que o dito nível total de IP-10 que corresponde à especificidade determinada.

Desse modo, um outro objetivo das realizações preferidas da presente invenção consiste na apresentação de um método imunológico para detectar se um mamífero encontrou um antígeno, em que o método compreende:

a) a determinação do nível de produção de IP-10 específico de antígeno em uma amostra do dito mamífero,

b) a construção de um gráfico percentual do nível de IP-10 obtido de uma população saudável,

c) a construção de uma curva de ROC (características operacionais do receptor) baseada no nível de IP-10 determinado na população saudável e no nível de IP-10 determinado em uma população que gerou a reatividade imunológica ao antígeno em questão,

d) a seleção de uma sensibilidade desejada,

e) a determinação, a partir da curva de ROC, da especificidade que corresponde à sensibilidade desejada,

f) a determinação do gráfico percentual do nível de IP-10 que corresponde à sensibilidade determinada; e

g) a predição do indivíduo para ter a reatividade imunológica ao antígeno se o nível de IP-10 na amostra for igual ou maior do que o nível de IP-10 que corresponde à sensibilidade determinada e a predição do indivíduo como improvável ou não de ter a reatividade imunológica ao

antígeno se o nível de IP-10 na amostra for mais baixo do que o dito nível total de IP-10 que corresponde à sensibilidade determinada.

A especificidade do método de acordo com a presente
5 invenção pode ser de 70% a 100%, mais preferivelmente de 80% a 100%, e mais preferivelmente ainda de 90% a 100%. Desse modo, em uma realização da presente invenção, a especificidade da invenção é de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,
10 98%, 99% ou 100%.

A sensibilidade do método de acordo com a presente invenção pode ser de 70% a 100%, mais preferivelmente de 80% a 100%, e mais preferivelmente ainda de 90% a 100%.

Desse modo, em uma realização da presente invenção,
15 a sensibilidade da invenção é de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%. Vide o exemplo 5.

O nível de IP-10 é comparado a um conjunto de dados de referência ou um valor de referência tal como o valor de
20 corte para determinar se o indivíduo está com um risco ou probabilidade maior, por exemplo, de infecção.

Para aumentar a eficiência da detecção o nível no sangue de IP-10 pode ser comparado a um conjunto de dados de referência para determinar se o indivíduo tem probabilidade
25 de ser infectado ou está correndo um risco maior de desenvolver, por exemplo, a infecção.

Para aumentar a eficiência da detecção, o nível de IP-10 induzido por PHA e o nível de IP-10 estimulado por antígeno pode ser comparado a um conjunto de dados de
30 referência para determinar se o indivíduo tem a infecção ou está correndo um risco maior de desenvolver a infecção ou a doença.

Para determinar se o paciente está correndo um risco maior de desenvolver, por exemplo, a infecção, um corte deve ser estabelecido. Este corte pode ser estabelecido pelo laboratório, médico ou em uma base de caso a caso por cada
5 paciente.

Alternativamente, o ponto de corte pode ser determinado como a média, o ponto mediano ou a média geométrica do grupo de controle negativo ((por exemplo, pacientes não infectados e não expostos saudáveis sem
10 infecção de TB) +/- um ou mais desvios padrão ou um valor derivado do desvio padrão).

Seguindo o estímulo de antígeno, alguns indivíduos respondem intensamente ao biomarcador, ao passo que outros não respondem. Por exemplo, alguns indivíduos podem não
15 mostrar respostas a IP-10 ou a IFN- γ , desse modo somente produzindo níveis baixos de IP10 ou IFN- γ . Nesses casos, a medição simultânea de dois, três, quatro ou mais biomarcadores irá aumentar a sensibilidade do ensaio e aumentar o número daqueles com resposta positiva. Com a c
20 combinação de IP-10 e um ou mais biomarcadores tais como, mas sem ficar a eles limitados, IFN- γ , IL-2 ou MCP-1 é, portanto, possível fazer predições de diagnóstico que são menos vulneráveis à energia de um único biomarcador.

Em uma outra realização preferida, as medições de
25 IP-10 de são combinadas com as medições de um ou mais outros biomarcadores, e comparadas a um nível de referência combinado. Os níveis medidos do biomarcador podem ser combinados por operações aritméticas tais como a adição, a subtração, a multiplicação e manipulações aritmética de
30 porcentagens, raiz quadrada, exponenciação, e funções logarítmicas. Várias combinações de biomarcadores e vários meios de calcular o valor de referência combinado podem ser

executados por meios conhecidos de um elemento versado na técnica.

Em uma outra realização preferida, medições individuais de biomarcadores (tais como, mas sem ficar a eles limitados, IP-10 em combinação com IFN- γ e/ou IL-2) podem ser combinadas depois que a concentração de biomarcador individual é comparada a um nível de referência, por exemplo, um ponto de corte. Esta abordagem gera um resultado de teste que cobre não somente diversos antígenos, mas também, diversos biomarcadores em um. Várias combinações de biomarcadores e vários meios de calcular o valor de referência combinado podem ser executados por meios conhecidos do elemento versado na técnica.

Em uma realização da presente invenção, a combinação do biomarcador IP-10 e um dos biomarcadores selecionados do grupo que consiste em MCP-1, IL-2 e INF- γ provê um efeito sinérgico com relação à sensibilidade e/ou à especificidade.

Em ainda uma outra realização da presente invenção, a combinação de biomarcadores IP-10, MCP-1 e IL-2 provê um efeito sinérgico com relação à sensibilidade e/ou à especificidade.

Em uma realização adicional da presente invenção, a combinação de biomarcadores IP-10, MCP-1 e IFN- γ provê um efeito sinérgico com relação à sensibilidade e/ou à especificidade.

Em uma outra realização da presente invenção, a combinação de biomarcadores IP-10, IL-2 e IFN- γ provê um efeito sinérgico com relação à sensibilidade e/ou à especificidade.

Especificamente tal como aqui utilizado, a sinergia refere-se fenômeno em que diversos biomarcadores agindo

conjuntamente criam "um sinal de biomarcador combinado" com maior sensibilidade ou especificidade para o diagnóstico, do que aquela prevista conhecendo somente a sensibilidade ou especificidade dos biomarcadores separados, desse modo
5 reduzindo o número de falso-positivos e aumentando o poder discriminatório.

Em uma leitura baseada em anticorpos tal como, mas sem ficar a eles limitada, ELISA ou teste de bastão imunocromatográfico, dois ou o mais anticorpos que ligam
10 biomarcadores diferentes irão permitir uma ligação aumentada da quantidade total de biomarcador, agindo por este meio na sinergia e conduzindo a respostas mais fortes e maior sensibilidade no teste. Uma leitura combinada pode ser executada de acordo com os presentes preceitos.

15 Avaliação de risco

Os autores da presente invenção identificaram com sucesso um novo marcador para medir uma resposta mediada por células a um antígeno. A concentração do marcador IP-10 é aumentada nos indivíduos com uma imunoresposta mediada por
20 célula a um antígeno. O IP-10 parece ser um marcador eficiente para a detecção, por exemplo, da infecção com M. tuberculosis.

A sensibilidade é mais elevada do que qualquer outro marcador estabelecido e a especificidade é comparável, ou melhor, do que com qualquer outro marcador estabelecido,
25 vide, por exemplo, os exemplos 4, 5 e 10).

O raciocínio estatístico pode, por exemplo, ser baseado no risco de ter a doença dependendo da idade, da ocupação, da exposição, dos antecedentes genéticos, do tipo
30 de HLA.

Os pontos de corte podem variar baseados em condições específicas do indivíduo testado, tais como, mas

sem ficar a eles limitadas, o risco de ter a doença, a ocupação, a residência geográfica ou a exposição.

Os pontos de corte podem variar baseados em condições específicas do indivíduo testado, tais como, mas sem ficar a eles limitadas, o envelhecimento, o sexo, os antecedentes genéticos (ou seja, o tipo de HLA), a função imunológica comprometida adquirida ou herdada (por exemplo, infecção por HIV, diabetes, pacientes com falha renal ou do fígado, pacientes em tratamento com as drogas imunomodificadoras tais como, mas sem ficar a eles limitadas, corticoesteróides, quimioterapia, bloqueadores de TNF- α , inibidores da mitose).

Ao fazer o ajuste do limite de decisão ou de corte será determinada desse modo a sensibilidade do teste para detectar uma infecção, se estiver presente, ou a sua especificidade para excluir a infecção ou a doença se estiver abaixo deste limite. Então o princípio é que um valor acima do ponto de corte indica um risco aumentado e um valor abaixo do ponto de corte indica um risco reduzido.

Além disso, as amostras de teste com resultados indeterminados devem ser interpretadas separadamente. Os resultados indeterminados são definidos como o resultado com um nível inesperadamente baixo de IP-10 na amostra estimulada por mitógeno (PHA). O ponto de corte final para um resultado de IP-10 indeterminado pode ser decidido de acordo com o grupo de estudo, e especialmente nos imunosuprimidos o nível de corte pode ser selecionado a um nível mais baixo.

Níveis de corte

Tal como será compreendido de maneira geral pelos elementos versados na técnica, os métodos para a seleção da imunoreatividade mediada por células são processos de tomada de decisão por comparação. Para qualquer processo de tomada de decisão, são necessários os valores de referência baseados

nos indivíduos que têm a doença ou condição de interesse e/ou os indivíduos que não têm a doença, a infecção ou a condição de interesse.

O nível de corte (ou ponto de corte) pode ser baseado em diversos critérios incluindo o número de indivíduos que devem seguir com mais testes de diagnóstico invasivos, o risco médio de ter e/ou desenvolver, por exemplo, a infecção para todos os indivíduos que seguem com mais testes de diagnóstico, uma decisão que qualquer indivíduo cujo risco específico de paciente é maior do que um determinado nível de risco tal como, por exemplo, 1 em 400 ou 1:250 (tal como definido pela organização da seleção ou o indivíduo sozinho) deve seguir para mais testes de diagnóstico invasivos ou outros critérios conhecidos dos elementos versados na técnica.

O nível de corte pode ser ajustado com base em diversos critérios tais como, mas sem nenhuma restrição, um determinado grupo de indivíduos testados. Por exemplo, o nível de corte poderia ser ajustado mais baixo nos indivíduos com imunodeficiência e nos pacientes com grande risco de progredir para a doença ativa, o corte pode ser mais elevado nos grupos de indivíduos então saudáveis com baixo risco de desenvolver a doença ativa.

Em uma realização, a presente invenção apresenta um método para determinar se um indivíduo tem uma infecção, o qual compreende:

- (a) a obtenção de uma amostra do indivíduo, e
- (b) a determinação quantitativa da concentração de IP-10 presente na amostra, da presença de polipeptídeo IP-10 presente na amostra a uma concentração igual ou maior do que o corte selecionado, indicando que o indivíduo provavelmente vai ter a infecção.

Mais especificamente, um aspecto da presente invenção refere-se a um método imunológico, o qual compreende as etapas de:

- 5 a) incubação de uma amostra obtida de um mamífero com o pelo menos um antígeno,
- b) determinação do nível de IP-10 na dita amostra,
- c) comparação do dito nível de IP-10 determinado com um nível de referência, determinando desse modo se o mamífero encontrou previamente o antígeno para gerar a reatividade imunológica ao antígeno ou encontrou previamente outros antígenos para gerar a retroreatividade imunológica ao antígeno.

Mais especificamente, um outro aspecto da presente invenção refere-se a um método imunológico, o qual compreende as etapas de:

- 15 a) incubação de uma amostra obtida de um mamífero com pelo menos um antígeno sem nenhuma estimulação subsequente e contanto que o antígeno não seja PPD,
- b) determinação do nível de IP-10 na dita amostra,
- 20 c) comparação do nível de IP-10 determinado com um nível de referência, determinando desse modo se o dito mamífero encontrou previamente pelo menos um dito antígeno que gera reatividade imunológica ao(s) dito(s) antígeno(s) ou encontrado previamente outros antígenos que gera a retroreatividade imunológica ao(s) antígeno(s).

Em uma realização, a presente invenção refere-se a um método de acordo com a presente invenção em que a amostra é dividida em pelo menos duas frações e compreende:

- 30 a) a incubação de uma amostra obtida de um mamífero com pelo menos um antígeno sem nenhuma estimulação subsequente e contanto que o antígeno não seja PPD para gerar uma amostra de resposta,

b) a incubação da segunda fração de amostra com uma solução inativa para gerar uma amostra Nil,

c) a determinação do nível de IP-10 nas duas frações,

5 d) a determinação da resposta a IP-10 dependente de antígeno da amostra ao subtrair o nível de IP-10 determinado na amostra Nil do IP-10 determinado na amostra de resposta,

e) a comparação da resposta a IP-10 dependente de antígeno ou um valor derivado do mesmo com o nível de referênci

10 a ou um valor derivado do mesmo,

desse modo determinando se o mamífero encontrou previamente o antígeno e desse modo gera reatividade imunológica ao antígeno ou encontrou previamente outros antígenos para gerar a retroreatividade imunológica ao antígeno e/ou vai desenvolver a infecção.

15

O valor discriminatório é um valor que é determinado ao medir o parâmetro ou parâmetros em uma população de controle saudável e em uma população com infecção conhecida, determinando desse modo o valor discriminatório que identifica a população infectada com uma especificidade predeterminada ou então uma sensibilidade predeterminada com base em uma análise da relação entre os valores de parâmetro e os dados clínicos conhecidos da população de controle saudável e a população de pacientes com infecção, tal como é aparente da discussão detalhada nos presentes exemplos. O valor discriminatório determinado desta maneira é válido para a mesma configuração experimental nos testes individuais futuros.

20

25

Nas configurações experimentais específicas aqui descritas (exemplo 5), foi verificado que o limite de nível de IP-10 útil como um valor de corte fica compreendido na faixa de, mas não limitado à mesma, de 14 pg/ml a 1.000 pg/ml. Preferivelmente, o corte fica compreendido na faixa

30

entre 100 pg/ml e 800 pg/ml, tal como na faixa de 100-600, por exemplo, na faixa de 150-400, tal como na faixa de 150-300, por exemplo, na faixa de 150-250, tal como na faixa de 175 - 215.

5 Preferivelmente, o valor de corte é de 180 pg/ml, 181 pg/ml, 182 pg/ml, 183 pg/ml, 184 pg/ml, 185 pg/ml, 186 pg/ml, 187 pg/ml, 188 pg/ml, 189 pg/ml, 190 pg/ml, 191 pg/ml, 192 pg/ml, 193 pg/ml, 194 pg/ml, 195 pg/ml, 196 pg/ml, 197 pg/ml, 198 pg/ml, 199 pg/ml, 200 pg/ml, 201 pg/ml, 202 pg/ml, 203 pg/ml,
10 204 pg/ml, 205 pg/ml, 206 pg/ml, 207 pg/ml, 208 pg/ml, 209 pg/ml, 210 pg/ml, 211 pg/ml, 212 pg/ml, 213 pg/ml, 214 pg/ml, 215 pg/ml, 216 pg/ml, 217 pg/ml, 218 pg/ml, 219 pg/ml, 220 pg/ml, 221 pg/ml, 222 pg/ml, 223 pg/ml, 224 pg/ml ou 225 pg/ml.

15 A diluição da amostra, medições combinadas com outros parâmetros tais como, mas sem ficar a eles limitados, interleucina-2, gama-interferon e/ou proteína-1 quimiotática de macrófago, ou outros parâmetros, irão resultar em outros valores de corte, que podem ser determinados de acordo com os
20 presentes preceitos. Outras configurações experimentais, outras amostras, outros antígenos, e outros parâmetros irão resultar naturalmente em outros valores de corte, que podem ser determinados de acordo com os presentes preceitos por um elemento versado na técnica pelos procedimentos de desenho
25 normais ou experiências rotineiras.

O nível do biomarcador específico de antígeno induzido também depende dos antígenos escolhidos para a estimulação. Alguns antígenos são indutores mais potentes do que outros, mas também o número de antígenos disponíveis
30 diferentes, isto é, peptídeos, irá resultar em um número aumentado de células que respondem e uma produção maior de biomarcador. Portanto, um ponto de corte também é dependente de antígeno, e dependente de doença. Além disso, outras

espécies têm outros grandes repertórios de antígenos de histocompatibilidade, portanto, os mesmos antígenos testados em espécies diferentes irão resultar em cortes específicos de espécies.

5 As medições da concentração do biomarcador podem ser traduzidas em unidades internacionais (IU). A IU refere-se à atividade biológica do biomarcador e é uma referência à marca comparativa entre vários métodos de medição. Em outras realizações da invenção, o valor de corte determinado pode
10 ser combinado com um índice de estimulação (definido como a concentração de IP-10 estimulado por antígeno dividido pela concentração de plasma não-estimulado).

Foi verificado que um valor do índice de estimulação fica compreendido na faixa de, mas não limitado à
15 mesma, 1 a 6 ou mais. Preferivelmente, o índice de estimulação é de pelo menos 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75 ou 4. A presente invenção apresenta mesmo o valor do índice de estimulação na faixa de várias centenas de vezes. Desse modo, o valor do índice de
20 estimulação de pelo menos 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, ou até mesmo 1.000 é contemplado.

O corte e o índice de estimulação podem ser diferentes para a infecção latente, a infecção recente, a
25 infecção sub-clínica ou a infecção ativa. Mais especificamente no caso da infecção com M. tuberculosis, o valor de corte e o índice de estimulação podem ser diferentes, por exemplo, para TB extra-pulmonar, TB pulmonar, ou ambos, infecção curada, e TB latente. O corte e o índice de estimulação, o nível da variação podem ser diferentes onde
30 a infecção é encontrada na presença de HIV, outras co-infecções, a imunossupressão.

Dependendo da predominância ou da predominância prevista da presença da doença, o nível de corte e/ou o

índice de estimulação podem ser ajustados para obter tão poucos resultados falso-positivos ou tão poucos resultados falso-negativos quanto desejado, dependendo da gravidade da doença e das conseqüências da determinação se o paciente é
5 positivo para o teste ou negativo para o teste. No caso da tuberculose, o ensaio apresentado na presente invenção tem uma vantagem evidente em relação aos outros testes in vitro atualmente disponíveis. Devido ao fato que a produção de IP-10 específico de antígeno é mais elevada do que a IFN- γ
10 produzida (vide, por exemplo, os exemplos 4 e 17), o corte e o índice de estimulação podem ser ajustados em faixas mais largas, ampliando desse modo a oportunidade para o diagnóstico.

O nível de corte pode ser diferente, se um único
15 paciente com sintomas tiver que ser diagnosticado ou o teste tiver que ser utilizado em uma seleção de um grande número de indivíduos em uma população.

O corte e o índice de estimulação podem ser baseados em medições de IP-10 combinadas e medições de outros
20 biomarcadores tais como, mas sem ficar a eles limitados, Interleucina-2, gama-interferon (INF- γ) e/ou a proteína 1 quimiocina de monócito/macrófago (MCP-1). Um corte e/ou um índice de estimulação compostos podem resultar em outros valores, que podem ser determinados de acordo com os
25 preceitos da presente invenção.

Embora qualquer um dos métodos analíticos conhecidos para medir os níveis destes análitos funcionem na presente invenção, tal como é óbvio ao elemento versado na técnica, o método analítico utilizado para cada marcador deve
30 ser o mesmo método utilizado para gerar os dados de referência para o marcador particular. Se um novo método analítico for utilizado para um marcador particular ou uma

combinação de marcadores, um novo conjunto de dados de referência, baseado nos dados desenvolvidos com o método, deve ser gerado.

A análise discriminatória multivariada e outras
5 avaliações de risco podem ser executadas no pacote estatístico de programa de computador comercialmente disponível Statistical Analysis System (manufaturado e vendido pelo SAS Institute Inc.) ou por outros métodos de análise estatística multivariada ou outros pacotes de
10 software estatístico ou software de seleção conhecidos dos elementos versados na técnica.

Tal como é óbvio ao elemento versado na técnica, em qualquer uma das realizações discutidas acima, a alteração do nível de corte do risco de um teste positivo ou a utilização
15 de riscos a priori diferentes que podem ser aplicados a subgrupos diferentes na população, poderia mudar os resultados da análise discriminatória para cada paciente.

Os testes de estabilidade aqui descritos propõem que o IP-10 é altamente estável com a manipulação de rotina
20 (isto é, congelamento ou armazenagem por períodos de tempo prolongados à temperatura ambiente e a temperaturas abaixo de 10°C); desse modo, os autores da presente invenção concluem que o IP-10 é um anárito atraente para o uso clínico. Os dados aqui apresentados sugerem que o IP-10 é um marcador
25 potencialmente valioso para o uso no prognóstico, no diagnóstico, no monitoramento e na seleção de doenças infecciosas.

A fim de determinar a gravidade clínica da imunoreatividade mediada por células, o meio para avaliar o
30 sinal detectável de IP-10 medido envolve uma referência ou um meio de referência.

A referência também torna possível contar em variações do ensaio e do método, variações do kit, variações

da manipulação, variações relacionadas à combinação de IP-10 e outros biomarcadores, e outras variações não relacionadas direta ou indiretamente ao nível de IP-10.

No contexto da presente invenção, o termo "referência" refere-se a um padrão com relação à quantidade, à qualidade ou ao tipo, contra o qual outros valores ou características podem ser comparados, tal como, por exemplo, uma curva padrão.

Os dados de referência refletem o nível de IP-10 para os indivíduos que têm imunoreatividade mediada por células (também indicados como afetados, expostos, vacinados, infectados ou doentes) e/ou o nível de IP-10 para os indivíduos normais (também indicados como não-afetados, não-expostos, não-vacinados, não-infectados ou saudáveis).

Em ainda uma realização da presente invenção, o dispositivo é selecionado do grupo que consiste em um ensaio, um imunoensaio, um bastão, um bastão seco, um dispositivo elétrico, um eletrodo, uma leitora (leitoras espectrofotométricas, leitoras de IR, leitoras isotópicas e leitoras similares), a histoquímica e meios similares que incorporam uma referência, papel de filtro, reação de cor visível a olho nu.

Ip-10

A proteína induzível por IFN- γ 10 (IP-10) ou CXCL10 é uma quimiocina. O gene de IP-10 é mapeado para 4q21 por meio de hibridização in situ. A expressão de IP-10 é regulada para cima por Interferons (IFNs, isto é, gama-interferon (IFN- γ)) e estímulos inflamatórios, e é expressa em muitas doenças inflamatórias do tipo Th1 em uma variedade de tecidos e tipos de células.

A seqüência de gene humano pode ser encontrada sob o número de ACESSO BC010954 (gi 15012099) no Gene Bank (Banco de Genes).

As quimiocinas são um grupo de moléculas estruturalmente relacionadas principalmente básicas pequenas (aproximadamente 8 a 14 kD) que regulam o tráfico de células de vários tipos de leucócitos através de interações com um subconjunto de receptores acoplados por proteína G de sete transmembranas. As quimiocinas também desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento, na homeostase e na função do sistema imunológico, e têm efeitos nas células do sistema nervoso central bem como nas células endoteliais envolvidas na angiogênese ou na angiostase. As quimiocinas são divididas em duas subfamílias principais, CXC e CC, com base no arranjo dos dois primeiros dos quatro resíduos de cisteína conservados; as duas cisteínas são separadas por um único aminoácido em quimiocinas CXC e são adjacentes nas quimiocinas CC. As quimiocinas CXC também são subdivididas nos tipos ELR e não-ELR com base na presença ou na ausência de uma seqüência glu-leu-arg adjacente e no terminal N em relação ao motivo de CXC. Os tipos de ELR são quimiotáticos para neutrófilos, ao passo que os tipos não-ELR são quimiotáticos para linfócitos.

O IP-10 inibe a formação de colônias de medula óssea, tem uma atividade anti-tumoral in vivo, é uma quimioisca para monócitos humanos e células T, e promove a aderência das células T às células endoteliais. O IP-10 é um inibidor potente da angiogênese in vivo. O IP-10 pode participar da regulação da angiogênese durante a inflamação e a tumorigenese. O IP-10 também é um gene alvo de RAS e é super-expresso na maior parte dos cânceres coloretais. Com a utilização da espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi mostrado que o IP-10 interagiu com o terminal N de CXCR3

através de uma fissura hidrofóbica formada pelo N-laço e a região de laços de 40s de IP-10, similar à superfície de interação de outras quimiocinas, tal como IL8. Foi encontrada uma região adicional de interação que consistia pelo em uma
5 fissura hidrofóbica formada pelo terminal N e o laço de 30s de IP-10. Sugerindo que um mecanismo envolvendo o laço de 30s e a configuração de beta cordão 2 pode ser o responsável pela interação e função antagonística de IP-10 com CCR3.

No caso da tuberculose, níveis elevados de IP-10
10 foram encontrados em nós de linfa e granulomas tuberculosos do pulmão, em efusões pleurais e no soro ou plasma de pacientes de TB e co-infectados com TB-HIV experimentando a síndrome de imunoreconstituição.

Determinação do nível de IP-10

15 A molécula de imuno efetor é preferivelmente uma citocina tal como, mas sem ficar a ele limitada, IP-10. A presença ou o nível do imunoefetor podem ser determinados ao nível da própria molécula ou até a extensão até a qual um gene é expresso. O nível de IP-10 é medido por métodos
20 analíticos convencionais, tais como os métodos imunológicos conhecidos no estado da técnica.

As medições do imunoefetor podem ser combinadas com as medições de outros imunoefetores ao nível de genes, de RNA, ou de proteína de acordo com os presentes preceitos.

25 Conforme indicado acima, a detecção das moléculas de imunoefetor pode ser feita aos níveis de proteína ou de ácido nucléico. Conseqüentemente, a referência à presença ou ao nível da dita molécula de imunoefetor inclui dados diretos e indiretos. Por exemplo, níveis elevados do mRNA de IP-10
30 são dados indiretos que mostram os níveis aumentados de IP-10. Os ligandos para os imunoefetores são particularmente úteis na detecção e/ou na quantificação destas moléculas.

Os anticorpos para os imunofetores são particularmente úteis. As técnicas para os ensaios aqui contemplados são conhecidas no estado da técnica e incluem, por exemplo, ensaios de sanduíche, multiplexação xMAP, Luminex, ELISA e ELISpot. A referência aos anticorpos inclui partes de anticorpos, anticorpos mamiferizados (por exemplo, humanizados), anticorpos recombinantes ou sintéticos e anticorpos híbridos e de cadeia simples.

Os anticorpos policlonais e monoclonais podem ser obtidos através da imunização com os imunofetores ou os fragmentos antigênicos dos mesmos e um ou outro tipo é utilizável para os imunoenaios. Os métodos de obtenção de ambos os tipos de soros são bem conhecidos no estado da técnica.

Os soros policlonais são menos preferidos mas são preparados de uma maneira relativamente fácil por meio da injeção de um animal de laboratório apropriado com uma quantidade eficaz do imunofetor, ou uma parte antigênica do mesmo, a coleta do soro ou do plasma do animal e o isolamento dos soros específicos por qualquer uma das técnicas imunoabsorventes conhecidas. Embora os anticorpos produzidos por este método sejam utilizáveis em virtualmente qualquer tipo de imunoenasão, geralmente eles são menos favorecidos por causa da heterogeneidade potencial do produto.

O uso de anticorpos monoclonais em um imunoenasão é particularmente preferido por causa da capacidade de produção dos mesmos em grandes quantidades e da homogeneidade do produto. A preparação de linhagens de células de hibridoma para a produção de anticorpo monoclonal derivada pela fusão de uma linhagem de células imortais e linfócitos sensibilizados contra a preparação imunogênica pode ser efetuada por técnicas que são bem conhecidas dos elementos versados na técnica.

A detecção também pode ser obtida pela medição direta de IP-10 ao utilizar o anticorpo específico em um imunoenensaio de polarização fluorescente competitiva (CFIPA) ou então pela detecção da homodimerização de gama-interferon pela polarização de fluorescência induzida por dimerização (DIFP). Em um ou outro caso, a detecção e a quantificação estarão abaixo ou menores do que 6 pg/ml.

Com o método utilizado atualmente no material de exemplo fornecido, o limite de detecção do ensaio é de 6 pg/ml, e com modificações este pode ser mais baixo.

Se o material de amostra for IP-10 diluído, a concentração na dita amostra será mais baixa mas ainda determinável (vide o exemplo 9). Outras configurações experimentais e outros parâmetros irão resultar em outros valores, os quais podem ser determinados de acordo com os presentes preceitos.

Diversas técnicas são conhecidas do elemento versado na técnica para a determinação de marcadores biológicos tais como IP-10. A presença ou o nível do imunofetor podem ser determinados por ELISA, Luminex, ELISPOT, técnicas baseadas em mRNA tais como RT-PCR ou citometria de fluxo intracelular.

Luminex

O gama-interferon (IFN- γ) tem sido o padrão ouro para a resposta a Thi na imunologia de doenças infecciosas e especialmente na imunologia de TB. O IFN- γ determinado por Luminex é um marcador pobre por causa de uma sensibilidade mais baixa em comparação ao ELISA comercial desenvolvido para o teste de Quantiferon (vide o exemplo 10). O IP-10, no entanto, é detectado facilmente por Luminex e pode, portanto, substituir o IFN- γ como uma ferramenta de pesquisa ou de seleção no sistema Luminex.

Os dados fornecidos em alguns dos exemplos abaixo são gerados pelo uso de Luminex, o que permite a multiplexação dos análitos na solução com citometria de fluxo. Utilizando uma técnica de propriedade, o Luminex colore internamente os códigos de microesferas de xMAP ao combinar relações diferentes de dois corantes fluorescentes. Cada conjunto de grânulos é conjugado com um anticorpo de captura diferente. O uso de anticorpos de detecção etiquetados com R-ficoeritrina permite a quantificação das reações de antígeno-anticorpo que ocorrem na superfície da microesfera, pela medição da intensidade de fluorescência relativa.

O sistema tem a capacidade de medir muitas amostras em volumes pequenos, e até 100 análitos diferentes podem ser medidos simultaneamente em uma única amostra de 50 µl.

Os dados atuais foram obtidos de acordo com o protocolo Biosource. Resumidamente, as suspensões de grânulos de kits individuais de IP-10 e IFN-γ foram combinadas em cavidades de 96 placas de filtro previamente umedecidas. Os grânulos foram lavados duas vezes com solução de lavagem e um tampão de incubação foi adicionado.

As amostras (aqui, 4-50 µl) foram diluídas 1:32, 1:10, 1:8 ou 1:1 na diluição do ensaio e adicionadas à placa. A placa foi incubada por duas horas à temperatura ambiente a 600 rpm em um agitador de placa de titulação. Depois de duas lavagens, 100 µl do coquetel do anticorpo de detecção foram adicionados por cavidade, e a placa foi incubada à temperatura ambiente por uma hora em um agitador de placa de titulação. Depois de duas lavagens, 100 µl de uma solução de estreptavidina-RPE foram adicionadas por cavidade. Finalmente, após uma incubação de trinta minutos e três lavagens, 100 µl

da solução de lavagem foram adicionados a cada cavidade, e a placa foi colocada na plataforma XY do Luminex.

De cada cavidade, um mínimo de 100 grânulos específicos de análito foi analisado para ambas as
5 fluorescências de grânulos e de RPE.

ELISA

Os dados fornecidos em alguns dos exemplos abaixo são gerados pelo uso de ELISA de acordo com o protocolo Biosource. As amostras (5 μ l a 50 μ l) foram adicionadas a 96 cavidades de
10 uma placa de fundo plano previamente carregada com os anticorpos IP-10. 50 μ l de conjugado de biotina foram adicionados a todas as cavidades. A placa foi coberta e incubada à temperatura ambiente por três horas antes do conteúdo das cavidades ser aspirado e lavado quatro vezes com
15 tampão Working Wash. 100 μ l de estreptavidina-HRP diluídos foram então adicionados a todas as cavidades e a placa foi coberta e incubada à temperatura ambiente por trinta minutos. A seguir, as cavidades foram aspiradas e lavadas quatro vezes com o tampão Working Wash antes de 50 μ l de Stabilized
20 Chromogen ser adicionado a cada cavidade, e a placa foi incubada à temperatura ambiente por trinta minutos, protegida da luz. 100 μ l da solução tampão foram adicionado finalmente a cada cavidade, e a placa foi lida em uma leitora de ELISA a 450 nm.

25 Testes Imunocromatográficos (ICT)

Princípio do Teste: O ICT (por exemplo, uma bastão lateral) é um teste de imunodiagnóstico in vitro que utiliza um anticorpo principal (Ab) e de um a quatro Ab's secundários, todos específicos para IP-10. O Ab principal é unido a ouro
30 coloidal e impregnado em um chumaço de amostra com uma pista que contem um Ab secundário em uma linha fixa.

Na primeira etapa, a amostra incubada é adicionada à parte esquerda do chumaço de amostra. O soro ou o plasma irá fluir para a frente na pista, permitindo que todo o IP-10 presente se ligue ao Ab principal etiquetado com ouro coloidal. O Ab secundário é imobilizado em uma linha através da membrana da pista. Quando o cartão é fechado, a amostra e o Ab principal etiquetado na pista do chumaço entram em contato com a extremidade da membrana. A amostra e o Ab principal etiquetado migram então ao longo da pista da membrana cruzando a linha de Ab secundário imobilizado.

Interpretação do teste: Qualquer IP-10 complexado com o Ab principal etiquetado com ouro é capturado pelo Ab secundário na membrana e ocorre uma mudança na cor na linha. O teste é então interpretado: a. com base na intensidade da cor ou b. ao comparar dois testes, um realizado na amostra de resposta (por exemplo, plasma do material de teste estimulado por antígeno tal como sangue integral) e um realizado na amostra Nil, ao subtrair a intensidade da mudança de cor no teste Nil da intensidade da mudança de cor no teste de Ag e ao comparar este a uma referência.

A leitura do teste também pode ser automatizada ou semi-automatizada ao utilizar uma interface computadorizada. Esta configuração poderia ser construída de modo que a interface automatizada determinasse uma intensidade da mudança de cor da linha.

Infecção

Um aspecto da presente invenção refere-se a um método em que a resposta a IP-10 específico de antígeno acima do nível de referência indica que o mamífero encontrou previamente o antígeno ou encontrou previamente outros antígenos para gerar a retroreatividade ao antígeno por causa, por exemplo, de um estágio infeccioso tal como a

doença ativa, a infecção subclínica ativa, a infecção recente ou latente ou vacinado).

Microorganismo

De acordo com a presente invenção, as infecções
5 podem ser causadas por microorganismos, tais como, mas sem ficar a eles limitados, bactérias, parasitas, fungos, vírus, príons, e/ou viróides.

Em uma realização atualmente preferida, o microorganismo é selecionado do grupo que consiste em
10 Mycobactiera, bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, Listeria, enterococci, Neisseria, vibrio, treponema (sífilis), Borrelia, leptospirae, Clamidia, retrovirus (SIV, HIV-1, HIV-2), cytomegalovirus, poxvirus, vírus de Ebstein barr, enterovirus, morbillivirus,
15 rhabdovirus (raiva), Rubivirus (rubéola), flavivirus (dengue, febre amarela), vírus de herpes, vírus de varicela-zoster, hepatite C e B, Leishmania, Toxoplasma gondii, trypanosoma, Plasmodium (falciparum, vivax, ovale, malária), pneumocystis cariini (PCP), Coronavirus (por exemplo, Síndrome
20 Respiratória Adquirida Grave (SARS)), Ebola ou Marburg e vários nematódeos, trematódeos.

Em uma realização ainda mais preferida, o microorganismo é selecionado do grupo que consiste em
25 Mycobactiera, Leishmaniasis, Clamidia, Trypanosomiasis e Schistosomiasis.

No caso em que a infecção é ou foi causada por Mycobactiera, a dita Mycobactiera pertence aos organismos complexos de M. tuberculosis (M. tuberculosis, M. bovis e M. africanum), Mycobactiera onde a região de diferença (RD1) não
30 foi suprimida (M. kansasii, M. szulgai, M. marinum, M. flavescens, M. gastrii), Mycobactiera patogênica aos seres humanos (M. avium e M. lepra) e outras micobactérias não tuberculosas.

Desse modo, em uma realização atualmente preferida a micobactéria é *M. tuberculosis*.

No caso em que a infecção é ou foi causada por *Chlamydia*, a dita *Chlamydia* pode ser selecionada do grupo que
5 consiste em *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*, *C. pneumoniae* e/ou *C. psittaci*.

Em uma realização preferida da presente invenção a *Chlamydia* é *C. trachomatis*.

Vacinação

10 Um aspecto da presente invenção refere-se a um método, no qual a resposta a IP-10 dependente de antígeno acima do nível de referência indica que o mamífero encontrou previamente o antígeno ou encontrou previamente outros antígenos para gerar a retroreatividade ao antígeno por causa
15 de uma vacinação contra qualquer microorganismo aqui mencionado.

A resposta a uma vacina baseada em material não-viável pode resultar em níveis baixos de liberação de IFN- γ específico de antígeno e, uma vez que o IP-10 é liberado em
20 quantidades elevadas, ele pode ser utilizado para detectar respostas vacinais em experimentações pré-clínicas, clínicas, e subsequentemente em uma configuração de rotina.

Tuberculose

25 A tuberculose (geralmente abreviada como TB) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, que afeta mais geralmente os pulmões (TB pulmonar), mas também pode afetar todos os órgãos restantes no corpo, por exemplo, o sistema nervoso central (meningite), o sistema linfático, o sistema circulatório (tuberculose
30 miliar), o sistema genitourinário, os ossos e as juntas. A infecção com *M. tuberculosis* também pode permanecer assintomática em um estágio que é geralmente conhecido como infecção de TB latente, dormente ou sub-clínica.

Em uma realização atualmente preferida, a presente invenção refere-se a um método de diagnóstico e monitoramento de várias apresentações distintas, por exemplo, da tuberculose: doença de tuberculose ativa, infecção de TB
5 ativa de microscopia positiva ou de microscopia negativa, infecção de tuberculose latente, e infecção de tuberculose recente.

O imunoensaio é baseado na avaliação da produção de IP-10 pelo linfócito T específico de antígeno na interação
10 com as células que apresentam antígeno (por exemplo, monócitos/macrófagos) que respondem às seqüências de peptídeos selecionadas de proteínas secretoras de MTB. Estas seqüências de peptídeos foram selecionadas quanto à sua imunogenicidade e sua especificidade, e potencialmente outros
15 peptídeos podem ser utilizados similarmente.

O método e o kit podem ser utilizados para diagnosticar a doença de tuberculose ativa, para diagnosticar uma infecção recente em contatos saudáveis de um paciente com uma tuberculose pulmonar esputo-positiva, para diagnosticar
20 saudável com infecção latente, para monitorar a resposta ao tratamento no caso de tuberculose pulmonar e extra-pulmonar, e para discriminar entre a infecção latente e ao estado de doença de tuberculose ativa.

Chlamydia

25 Chlamydia é um termo comum para a infecção com qualquer bactéria que pertence ao filo Chlamydiae. Chlamydia trachomatis é uma grande causa infecciosa de doenças nos olhos humanos e genitais. C. trachomatis é encontrada naturalmente vivendo somente dentro de células humanas e é
30 uma das infecções sexualmente transmitidas das mais comuns nas pessoas em todo o mundo - aproximadamente quatro milhões de casos de infecção com Chlamydia ocorrem nos Estados Unidos a cada ano. Nem todas as pessoas infectadas exibem sintomas

da infecção. Aproximadamente metade de todos os homens e três quartos de todas as mulheres que têm Chlamydia não têm nenhum sintoma e não sabem que estão infectados. Pode ser séria mas é curada facilmente com antibióticos se for detectado a tempo. Igualmente importante, a infecção dos olhos por Chlamydia é a causa mais comum de cegueira prevenível no mundo.

Em uma realização atualmente preferida, a presente invenção refere-se a um método de diagnóstico e monitoramento da infecção por Chlamydia.

O imunoenensaio é baseado na avaliação da produção de IP-10 pelo linfócito T específico de antígeno na interação com células que apresentam antígeno (por exemplo, monócitos/macrófagos) que respondem os antígenos brutos ou antígenos purificados tais como, mas sem ficar a eles limitados, os peptídeos. Potencialmente, as seqüências de peptídeos podem ser selecionadas quanto á sua imunogenicidade e a sua especificidade, e potencialmente outros peptídeos podem ser utilizados similarmente.

20 Antígeno

A escolha do antígeno apropriado para a presente invenção, também indicado como antígeno(s) de teste, e o antígeno selecionado para a avaliação, depende do tipo de infecção que o elemento versado na técnica gostaria de avaliar, e conseqüentemente os antígenos selecionados são associados a doenças. Por exemplo, quando é minitorada a infecção de MTB todos os antígenos disponíveis de MTB podem gerar a resposta necessária, e vice-versa. Diversos antígenos já são utilizados nos ensaios comerciais existentes. Deve ser compreendido que qualquer característica e/ou aspecto discutido acima ou abaixo em relação ao(s) antígeno(s) de teste de acordo com a invenção se aplicam pela analogia ao antígeno selecionado para a avaliação.

Onde se acredita que a infecção está relacionada à tuberculose, o antígeno ou pelo menos um antígeno é selecionado do grupo que consiste em antígenos RD-1, ESATt-6, CFP10, TB7.7, Ag 85, HSP-65, Ag85A, Ag85B, MPT51, MPT64, 5 TB10.4, Mtb8.4, hspX, Mtb12, Mtb9.9, Mtb32A, PstS-1, PstS-2, PstS-3, MPT63, Mtb39, Mtb41, MPT83, 71-kDa, PPE68 e LppX.

Em uma realização atualmente preferida, o antígeno ou pelo menos um antígeno são selecionados do grupo que consiste em antígenos ESAT-6, CFP-10 TB 7.7, Aa 85, HSP 65 e 10 RD-1.

Em ainda uma realização da presente invenção, o antígeno é ESAT-6.

Em uma outra realização da presente invenção, o antígeno é CFP-10.

15 Em uma realização adicional da presente invenção, antígeno é TB 7.7.

Em uma realização atualmente preferida da presente invenção, os antígenos são antígenos RD-1.

Diversas instituições de pesquisa estão trabalhando 20 na identificação dos antígenos solenemente expressos pelo agente infeccioso individual, denominados antígenos específicos de micróbios ou de doenças. No caso de M. tuberculosis, os antígenos específicos são expressos em estágios diferentes de infecção tais como, mas sem ficar a 25 eles limitados, os estágios dormente, latente, ativo, recente, pulmonar, extra-pulmonar, localizados ou curados.

A presente invenção pode ser implementada ao utilizar tais antígenos, desse modo provendo uma ferramenta para a identificação desse estágio específico (por exemplo, a 30 infecção latente com M. tuberculosis).

Em uma realização preferida, diversos antígenos do mesmo microorganismo podem ser adicionados ao gerar a amostra de resposta. Com a adição de diversos antígenos com várias

preferências de tipos de tecidos, a intensidade do ensaio é aumentada. No caso da tuberculose, a combinação antígeno-peptídeos de ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 e proteínas aumenta a probabilidade do teste cobrir a faixa mais ampla de tipos de tecidos e desse modo propiciando resultados de teste mais intensos e mais confiáveis em populações de pacientes diferentes.

Onde se acredita que a infecção está relacionada a Chlamydia, o antígeno ou pelo menos um antígeno é selecionado do grupo que consiste em extrato de Serovar D, da proteína de membrana externa principal (MOMP), de proteínas de membrana externa rica em cisteína (OMPs), OMP2, OMP3, OMPs polimórficas (pOMPs), difosfato de adenosina/adenosina trifosfato de adenosina de Chlamydia pneumonia, proteínas porina B (PorBs), e CT521.

Tal como é aparente da presente invenção, a fonte da infecção pode variar. Em uma realização da presente invenção, o antígeno ou pelo menos um antígeno são selecionados do grupo que consiste em epimastigotos fixados, tripomastigotos fixados, epimastigotos rompidos, tripomastigotos rompidos, frações antigênicas purificadas de epimastigotos, frações entigênicas semi-purificadas de epimastigotos, antígenos excretores-secretadores de tripomastigoto (TESA), antígeno de tipo variável predominante (VAT), glicoproteína de superfície variável (VSG), trans-sialidase (TS), por exemplo TS13, proteína-2 de superfície de amastigoto (ASP2), KMP-11m, CRA, Ag30, JL8, TCR27, Ag1, JL7, H49, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, MAP, SAPA, TCNA, Ag13, TcD, B12, TcE, JL5, A13, 1F8, Tc-24, Tc-28, Tc-40, Cy-hsp70, MR-HSP70, Grp-hsp78, CEA, CRP, SA85-1.1, FCaBP (proteína de ligação de Ca^{2+} flagelar), FL-160 (proteína de superfície flagelar de 160 kDa) e FRA (antígeno repetitivo flagelar), em que os ditos antígenos são relacionados a Trypanosomas.

Em uma realização preferida da presente invenção, o antígeno ou pelo menos um antígeno são selecionados do grupo que consiste em epimastigotos fixados, tripomastigotos fixados, epimastigotos rompido, tripomastigotos rompidos, 5 frações antigênicas purificadas de epimastigotos, frações antigênicas semi-purificadas de epimastigotos, antígenos excretadores-secretadores de tripomastigoto (TESA), antígeno de tipo variável predominante (VAT), glicoproteína de superfície variável (VSG), trans-sialidase (TS), por exemplo, TS13, 10 proteína-2 de superfície de amastigoto (ASP2), FCaBP (proteína de ligação e Ca^{2+} flagelar), FL-160 (proteína de superfície flagelar de 160 kDa) e FRA (antígeno repetitivo flagelar).

No caso em que a infecção está relacionada a 15 schistosoma, o antígeno ou pelo menos um antígeno é selecionado do grupo que consiste em ovo de schistosoma rompido, glicoproteínas excretadas/secretadas (ES), glicoproteínas tegumentais (TG), antígeno de ovo solúvel (SEA), extrato solúvel de *S. mansoni* (SWAP), hemocianina de 20 lapa minúscula (KLH), RP26, Sj 31, Sj 32, paramiosina, Sm62-IrV5, Sm37-SG3PDH, Sm28-GST, Sm14-FABP, PR52-filamin PL45-fosfoglicerato quinase, PN18-ciclofilina, MAP3, Sm23, MAP4, Sm28-TPI, Sm97, CAA, CCA e proteína 70 de choque térmico de *Schistosoma mansoni*.

25 Em uma realização preferida da presente invenção, o antígeno ou pelo menos um antígeno são selecionados do grupo que consiste em glicoproteínas excretadas/secretadas (ES), glicoproteínas tegumentais (TG), antígeno de ovo solúvel (SEA), extrato solúvel de *S. mansoni* (SWAP), hemocianina de 30 lapa minúscula (KLH) e RP26.

Com respeito a leishmania, o antígeno ou pelo menos um antígeno são selecionados do grupo que consiste em promastigozies rompidos, leishmanin, rGBP, rORFF, rgp63, rK9,

rK26, rK39, PN18-ciclofilina, MAP3, Sm23, MAP4, Sm28-TPI, Sm97, CAA e CCA.

Realmente, qualquer antígeno específico para a espécie a ser analisada pode ser útil de acordo com a presente invenção.

Em uma outra realização preferida, uma gama de antígenos diferentes de doenças diferentes pode ser combinada para permitir uma ferramenta de seleção com baixa especificidade para a doença individual, mas alta sensibilidade para a "infecção". Um kit que combina, por exemplo, um palette de antígenos de micróbios soldados é exposto durante a missão (por exemplo, malária, tuberculose, leishmania, esquistossomose e/ou tripanosomiose) irá permitir que os médicos realizem um teste de seleção rápido em vez de uma gama de testes diferentes.

Em uma outra realização preferida, os kits combinados podem compreender os antígenos de vários micróbios que infectam um órgão (por exemplo, as espécies de Nesseria e de Chlamydia que causam doença inflamatória Pélvica), ou compreender os antígenos de agentes infecciosos que causam sintomas comuns (por exemplo, a diarreia tratável causada pela infecção por campylobacter e shigella, poderia ser distinguida da diarreia não-tratável causada por vírus, por exemplo, rotavirus).

25 Indivíduo

A referência a um "indivíduo" inclui uma espécie humana ou não-humana, incluindo primatas, animais domésticos (por exemplo, carneiros, vacas, porcos, cavalos, asnos, cabras), animais de teste de laboratório (por exemplo, camundongos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia, hamsters), animais companheiros (por exemplo, cães, gatos), espécies de aves (por exemplo, aves domésticas, aves de aviários), répteis e anfíbios. A presente invenção tem aplicabilidade,

portanto, na medicina humana, bem como aplicações em animais domésticos e veterinários e da vida selvagem.

Generalidades

5 A referência a qualquer técnica anterior neste relatório descritivo não é, e não deve ser tomada, como um reconhecimento ou nenhuma forma de sugestão que esta técnica anterior faz parte do conhecimento geral comum em qualquer país.

10 Todas as referências de patentes e que não de patentes citadas no presente relatório descritivo são aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade.

15 Tal como é aparente, as características e as peculiaridades preferidas de um aspecto da invenção podem ser aplicáveis a outros aspectos da invenção. A invenção pode ser incorporada em outras formas específicas sem que se desvie do caráter ou das características essenciais da mesma. As realizações acima devem, portanto, ser consideradas em todos os respeitos ilustrativos e não limitadores na invenção aqui descrita. O âmbito da invenção é indicado desse modo pelas reivindicações anexas e não pela descrição acima, e todas as mudanças que se enquadram dentro do significado e da faixa de equivalência das reivindicações devem ser aqui englobadas a título de referência.

25 Deve ser compreendido que qualquer característica e/ou aspecto discutido acima em relação aos métodos de acordo com a invenção se aplicam por analogia aos métodos de diagnóstico.

30 Por todo este relatório descritivo, deve ficar entendido que a palavra "compreende", ou as variações tais como "compreendem" ou "compreendendo", implica a inclusão de um elemento, um número inteiro ou uma etapa, ou um grupo indicado de elementos, números inteiros ou etapas, mas não a

exclusão de qualquer outro elemento, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas.

A invenção será descrita em seguida por meio das seguintes figuras e exemplos não-limitadores.

5 Legendas das figuras

Figura 1

Correlação entre IFN- γ de plasma, IP-10 e IFN- γ . O sangue integral foi estimulado por 20-24 horas com solução salina (não-estimulada) (1a), antígenos específicos de M. tuberculosis (1b) ou mitógeno (1c). A produção de citocina foi medida em sobrenadantes de plasma por ELISA (IFN- γ) ou multiplex (IP-10).

Figura 2

15 Comparação da produção de antígeno específico de IFN- γ e citocina IP-10 (isto é, Ag-Nulo) medida por Quantiferon ELISA e Luminex, respectivamente. Os valores são em pg/ml. As linhas retas representam valores medianos, para a faixa vide a tabela 2.

Figura 3

20 Curva de ROC que apresenta a sensibilidade e a especificidade do ensaio de IP-10. O eixo x apresenta a 1-especificidade, e o eixo y a sensibilidade.

Figura 4

25 Comparação da produção de antígeno específico de IP-10 e IFN- γ . O IFN- γ é examinado e o IP-10 não-diluído é analisado a uma diluição de 1:8.

Figura 5

30 Produção de IFN- γ e IP-10/CXCL10 específico de antígeno nos pacientes com um teste de Quantiferon negativo ou indeterminado

Sangue integral de 6 Quantiferon em tubo (QFT-IT) negativo e paciente de TB indeterminado de DFT-IT foi estimulado por 20-

24 horas com solução salina ou antígenos específicos de *M. tuberculosis*. A produção de citocina pela foi medida no sobrenadante do plasma de ELISA (IFN- γ) e tecnologia de multiplex (IP-10). A produção específica de antígeno representa a amostra estimulada por antígeno subtraída da amostra não-estimulada. As linhas retas representam os valores medianos, (teste de classificação assinado Wilcoxon).

Exemplos

Nos seguintes exemplos o desempenho do ensaio de IP-10 é demonstrado ao utilizar a infecção com *Mycobacterium tuberculosis* e *Chlamydia Trachomatis* como exemplos do princípio de teste

Métodos gerais

Nos exemplos 1-17 foi utilizada a estimulação do sangue integral para demonstrar o princípio e no exemplo 18 foram utilizadas células mononucleares de sangue purificadas (PBMCs).

Estimulação do sangue integral

1. O volume de 1 ml de sangue heparinizado foi extraído em três tubos vacutainer (Cellestis, Austrália) revestidos com:
 - a. solução salina, para gerar a amostra não-estimulada ou a amostra Nil (utilizadas intercambiavelmente)
 - b. peptídeos derivados das proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB-7.7 para gerar a amostra do antígeno (Ag)
 - c. fitohemaglutinina (PHA) para gerar a amostra do mitógeno.
2. Os tubos foram incubados por 20-24 horas a 37°C.
3. Os tubos foram centrifugados por dez minutos a 2.000 rpm.
4. O plasma foi coletado e congelado a -40°C ou menos.

Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

1. As PBMCs foram separadas do sangue integral por meio de centrifugação de gradiente de densidade (Lymphoprep; Nycomed) e congeladas em nitrogênio líquido até o uso.

2. As PBMCs foram descongeladas e resuspensas em RPMI 1640, suplementadas com 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de aminoácidos não-essenciais, 1% de glutamina, 1% de pirovat, 1% de HEPES, e 10% de soro humano AB (banco de sangue local, Rigshospitalet, Copenhagem).

3. A viabilidade e o número de células foram determinados por tingimento com nigrosin.

4. As células foram cultivadas em triplicata em placas de fundo redondo de microtitulação (Nunc) a $1,25 \times 10^5$ células a um volume total de 100 μ l.

Preparação do antígeno de extrato D da cepa serovar de C. Trachomatis

1. A cepa D serovar de Chlamydia Trachomatis (UW-3/Cx) foi propagada em 229 células HeLa e fracionada em 30 frações de peso molecular estreito ao utilizar uma técnica de multieluição.

2. Serovar D de C. Trachomatis em tampão de SPG foi centrifugada a 30.000 g por trinta minutos.

3. A pelota foi resuspensa a 1:1 em água estéril e tampão de amostra de redução de laemmlí, seguida por uma ebulição por cinco minutos.

4. Após a sonicação repetida, a suspensão foi centrifugada a 30.000 g por trinta minutos.

5. O extrato da cepa D serovar de C. Trachomatis cru do sobrenadante foi utilizado como antígeno.

Estimulação de PBMC com o antígeno de Serovar D

1. As PBMCs foram chapeadas tal como descrito acima e as células foram estimuladas com:

a. 2 μ g/ml de antígeno de serovar D para gerar a amostra de antígeno

b. Sem antígeno para gerar a amostra não-estimulada.

2. As células foram incubadas a 37°C no ar umidificado (5% de CO₂ e 95% de ar).

3. Os sobrenadantes foram coletados após cinco dias para a quantificação de IP-10.

5 4. O plasma foi coletado e congelado a -40°C ou menos.

Medições de Biomarcadores

Luminex:

IP-10 e/ou MCP-1 e/ou IL-2 foram medidos na plataforma de Luminex e executados de acordo com o protocolo Biosource.

10

1. Suspensões de grânulos de IP-10 individual, IL-2, MCP-2 e/ou kits de IFN- γ foram combinados em placas de filtro de 96 cavidades previamente umedecidas.

2. Os grânulos foram lavados duas vezes com solução de lavagem e o tampão de incubação foi adicionado.

15

3. As amostras foram diluídas 1:1, 1:8 1:10, ou 1:20 na diluição de ensaio e 100 μ l foram adicionados à placa.

4. A placa foi incubada por duas horas à temperatura ambiente a 600 rpm em um agitador de placa de titulação.

20

5. Depois de duas lavagens, 100 μ l do coquetel de anticorpo de detecção foram adicionadas por cavidade, e a placa foi incubada à temperatura ambiente por uma hora em um agitador de placa de titulação.

6. Depois de duas lavagens, 100 μ l de uma solução de estreptavidina-RPE foram adicionados por cavidade.

25

7. Após uma incubação de trinta minutos e três lavagens, 100 μ l da solução de lavagem foram adicionados a cada cavidade e a placa foi colocada na plataforma XY do Luminex.

8. De cada cavidade, um mínimo de 100 grânulos específicos do análito foi analisado quanto à fluorescência de grânulos e de RPE.

30

ELISA de IP-10

As medições de IP-10 foram feitas ao utilizar um ELISA do tipo de etapa única da Biosource (Invitrogen, EUA).
ELISA de IFN- γ

As medições de IFN- γ foram feitas ao utilizar um
5 ELISA do tipo de sanduíche de uma única etapa; ELISA de IFN- γ
de Quantiferon (Cellestis, Austrália). Os níveis de IFN- γ
foram analisados ao utilizar o software fornecido pelo
fabricante (versão 2.50). O kit de ELISA da Cellestis opera
em unidades internacionais (U) (1 Unidade/ml corresponde a
10 uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$) e nos presentes exemplos são
apresentados os resultados de ELISA de IFN- γ em pg/ml .
Teste de Quantiferon (teste de QFT-IT)

A produção de IFN- γ é medida ao utilizar ELISA de
Quantiferon. De acordo com as diretrizes dos fabricantes, a
15 resposta a IFN- γ da amostra não-estimulada é subtraída da
resposta a IFN- γ na amostra estimulada com antígenos
específicos de *M. tuberculosis* e na amostra do mitógeno. O
resultado de QFT-IT era considerado "positivo" se a resposta
aos antígenos específicos fosse $\geq 17,5 \text{ pg/ml}$ (0,35 IU/ml) e \geq
20 25% do valor não-estimulado, independentemente da resposta a
IFN- γ estimulada por mitógeno; "negativo" se a resposta aos
antígenos específicos fosse $< 17,5 \text{ pg/ml}$ (0,35 IU/ml) e a
resposta a IFN- γ estimulada por mitógeno fosse $\geq 25 \text{ pg/ml}$
(0,5 IU/ml). Um teste era considerado "indeterminado" se
25 qualquer um da resposta aos antígenos específicos fosse $<$
17,5 pg/ml (0,35 IU/ml) e a resposta a IFN- γ estimulada por
mitógeno fosse $\leq 25 \text{ pg/ml}$ (0,5 IU/ml); ou a resposta a IFN- γ
na amostra não-estimulada fosse $\geq 400 \text{ pg/ml}$ (8 IU/ml) não
obstante específico de antígeno ou o mitógeno estimulou a
30 resposta.

Exemplo 1

Os níveis elevados do plasma IP-10 são induzidos pela estimulação do sangue integral com antígenos específicos de *M. tuberculosis* dos pacientes infectados com *M. tuberculosis*.

5 Foi testado o sangue integral de doze pacientes com tuberculose pulmonar esputo-positiva da Dinamarca (n = 2) e de Guiné Bissau (n = 9), e 11 controles dinamarqueses não expostos a TB saudáveis (médicos jovens, pesquisadores e estudantes do departamento de doenças infecciosas e da
10 unidade de pesquisa clínica no Hospital Hvidovre). Nenhum paciente era HIV positivo. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética de Copenhagem e pela Frederiksberg Commune, e pelo Comitê de Ética de Guiné Bissau.

Resultados

15 Os níveis de IFN- γ e IP-10 (valores médios e faixa) no plasma de amostras de sangue integral incubadas com Nil, Ag ou mitógeno, medidos por Luminex IP-10, Luminex de IFN- γ ou por ELISA de IFN- γ de Quantiferon comercial são apresentados na tabela 1.

20 A produção de IP-10 após a incubação com os antígenos específicos de *M. tuberculosis* é fortemente associada com a presença de uma infecção por *M. tuberculosis* no paciente; Níveis muito elevados de IP-10 no plasma, 1.025 pg/ml (faixa: 497,3 - 2080,4 pg/ml), da cultura de sangue
25 integral foram induzidos durante a estimulação com os antígenos específicos de *M. tuberculosis* nos pacientes infectados com *M. tuberculosis*, ao passo que níveis muito baixos de IP-10 de 40,4 pg/ml (faixa: 19,7 - 158,8) foram observados na cultura do sangue integral dos onze indivíduos
30 dinamarqueses saudáveis sem nenhuma exposição conhecida ou sinais de infecção por *M. tuberculosis* (controles). A diferença entre os dois grupos era altamente significativa; p

< 0,0001 mostra que a liberação de IP-10 é realmente induzida por antígeno.

A quantidade de IP-10 estimulado por antígeno de 1.024 pg/ml (faixa de 497 - 2.080 pg/ml) era significativamente mais elevada do que os níveis de IFN- γ determinados por ELISA de 223,5 (99 - 1.283 pg/ml) e por Luminex 90,7 pg/ml (37 - 464 pg/ml) (p = 0,01 e 0,001).

Em comparação com IP-10, níveis significativamente mais baixos do plasma de IFN- γ foram determinados por Quantiferon-ELISA, mas a diferença entre aqueles infectados por TB e não-infectados por TB ainda era significativa. O IFN- γ medido por Luminex era ainda mais baixo do que o IFN- γ medido por ELISA de QFT-IFN- γ e, portanto, não será discutido adicionalmente.

Concluindo, o IP-10 é um marcador altamente específico para a infecção por M. tuberculosis quando o sangue integral de uma pessoa infectada é estimulado com os antígenos específicos de M. tuberculosis. O IP-10 é muito mais fácil de medir e tem um grande potencial como marcador mais sensível devido aos níveis elevados liberados.

Tabela 1

Produção de IFN- γ e IP-10 (pg/ml) no plasma de solução salina, antígeno, ou sangue integral estimulado por mitógeno de:		
	Controles (n = 11)	Pacientes com TB (n = 12)
IFN- γ (ELISA)		
Solução salina	8,5 (6,5 - 11,5)	10,3 (6,5 - 134,5)
Antígenos	8,9 (5,0 - 14,0)	223,5 (99,0 - 1283,0) ^b
Mitógeno	1613,0 (45,5 - 1798,5)	272,8 (31,5 - 1750,5)
IFN- γ (Multiplex)		
Solução salina	5,0 (5,0 - 11,5)	5,0 (5,0 - 70,2)
Antígenos	5,0 (5,0 - 11,8)	90,7 (37,3 - 464,2) ^b
Mitógeno	291,9 (5,0 - 2980,7)	160,9 (5,0 - 2913,4)

IP-10			
Solução salina	27,1 140,6)	(17,7 - 140,6)	150,9 (61,1 - 991,9) ^c
Antígenos	40,4 158,8)	(19,7 - 158,8)	1025 (497,3 - 2080,4) ^b
Mitógeno	993,5 >2800)	(164,0 - >2800)	843,0 (384,4 - 2587,9)

Tabela 1: Produção de IFN- γ e IP-10 na cultura do sangue integral.

O sangue integral foi estimulado por 20-24 horas com solução salina (não-estimulado), antígenos específicos de M. tuberculosis ou mitógeno. A produção de citocina foi medida por ELISA (IFN- γ) e multiplex (IFN- γ , IP-10).

^aOs valores são médios (faixa).

^b Significativamente diferentes ($P < 0,0001$).

^c Significativamente diferentes ($P < 0,0005$).

10 ^d Significativamente diferentes ($P < 0,008$).

Teste de Kruskal-Wallis

Exemplo 2

Liberação de IP-10 espontânea elevada no plasma de cultura de sangue integral não-estimulado (amostra Nil) dos pacientes com infecção ativa de TB; IP-10 como marcador para a doença ativa

Conforme observado na tabela 1, os pacientes com tuberculose ativo tiveram níveis de plasma 5,6 vezes maiores de IP-10 em amostras de sangue integral não-estimulado (Nil) (150,9 pg/ml (61,1 - 991,9)) em comparação aos controles saudáveis (27,1 pg/ml (17,7 - 140,6)) $p = 0,0005$. Não houve nenhuma diferença significativa no IP-10 de plasma Nil entre os pacientes com tuberculose ativa de Guiné Bissau e da Dinamarca ($p = 0,67$).

25 Conclusão: Isto indica que a determinação da liberação de IP-10 espontânea em combinação com a liberação de IP-10 estimulada por antígeno pode ser utilizada para

discriminar os indivíduos saudáveis dos pacientes com TB ativo.

Exemplo 3

Correlação entre a liberação de IFN- γ e IP-10

5 Há uma forte correlação entre a liberação de IFN- γ e IP-10 na cultura do sangue integral, mas a liberação de IP-10 é de maior magnitude. As respostas individuais a IP-10 após a estimulação Nil, com antígeno ou mitógeno e os IFN- γ de ELISA correspondentes são mostrados nas figuras 1a-c.

10 Houve uma forte correlação entre os níveis de IP-10 e IFN- γ de ELISA no plasma do sangue integral estimulado por antígeno (spearman $r = 0,87$, 95% C.I 0,71 a 0,95, $p < 0,0001$) (figura 1b) e no plasma do sangue integral estimulado por mitógeno, embora não no mesmo nível ($r = 0,54$, 95% C.I. 0,15 a 0,78, $p = 0,008$ (figura 1c).

15

Conclusão: A liberação de IP-10 e de IFN- γ na cultura do sangue integral é correlacionada, mas a liberação de IP-10 é de uma magnitude maior. Isto torna IP-10 um marcador melhor do que IFN- γ em testes de TB in vitro.

20 Exemplo 4

A produção de IP-10 específico de antígeno é mais elevada do que a produção de IFN- γ específico de antígeno

Para determinar a quantidade de citocina liberada em resposta aos antígenos presentes na cultura (isto é, a resposta a citocina específica de antígeno (Ag-específica)).

25 A resposta a citocina específica de antígeno foi calculada como um valor delta (= produção de citocina em cultura de sangue integral estimulada por antígeno subtraída pela quantidade liberada no plasma de cultura de sangue integral não-estimulada). O valor delta permite que seja feita a

30 comparação da produção de IFN- γ específico de antígeno e de citocina IP-10. Conforme observado na figura 2, o ensaio de

IP-10 mede os valores mais elevados de IP-10 Ag-específico (870,4 pg/ml (260,5 - 1575,9 pg/ml)) em comparação a IFN- γ Ag-específico (216,5 pg/ml (80,5 - 1273,0 pg/ml)) $p = 0,006$ (Mann-Whitney). Os valores médios e as faixas são apresentados na tabela 2.

Conclusão: O Ip-10 é liberado em quantidades maiores ($p = 0,006$) e desse modo é mais fácil de medir e parece um marcador melhor do que IFN- γ .

Tabela 2

	Controles (n = 11)	TB (n = 12)	Valores de P
INF- γ , Quantiferon Elisa (pg/ml)			
Ag-Nil, média (faixa)	-0,5 (-3,5 - 3,5)	216,5 (80,5 - 1273,0)	< 0,0001
IP-10, Luminex (pg/ml)			
Ag-Nil, média (faixa)	10,8 (1,1 - 27,6)	870,4 (260,5 - 1575,9)	< 0,0001

10 Tabela 2. Comparação de produção de INF- γ Ag-específico e citocina IP-10 medida por Quantiferon ELISA e Luminex, respectivamente (teste de Kruskal-Wallis).

Exemplo 5

15 Sensibilidade e especificidade muito elevadas do ensaio de IP-10

A sensibilidade e a especificidade muito elevadas do ensaio de IP-10 são demonstradas ao utilizar TB como um exemplo do princípio de teste. A sensibilidade e a especificidade elevadas do ensaio de IP-10 descrito na invenção são determinadas ao utilizar uma análise da curva de ROC baseada em níveis dos valores de IP-10 específico de antígeno (Nil subtraído estimulado por antígeno). A presente análise da curva de ROC é baseada em doze pacientes de TB e onze controles saudáveis descritos no exemplo 1. Na figura 3 é demonstrado que o teste de IP-10 segrega perfeitamente entre os pacientes com tuberculose ativa e os controles

saudáveis. Nesta experiência o teste de IP-10 tem uma área sob a curva (AUC) igual a 1,0.

Conclusão: Foi demonstrado que o ensaio de IP-10 utilizado no diagnóstico da infecção por *M. tuberculosis* é 5 100% sensível e 100% específico, que é um desempenho melhor do que aquele utilizado atualmente em testes de TB in vitro. O teste de IP-10 pode aqui claramente discriminar entre 10 pacientes com e sem infecção por tuberculose. Com base neste material limitado, é possível ajustar o corte entre 27,6 pg/ml e 260,5 pg/ml e obter a segregação completa.

Exemplo 6

O IP-10 é um marcador eficiente para a TB latente em imunossuprimidos

O sangue integral de seis pacientes com artrite 15 reumatóide (RA) recebendo corticosteróides e methotrexate® foi estimulado com Nil, um antígeno específico de *M. tuberculosis* (ESAT6), ou mitógeno (PHA). A concentração de IP-10 foi medida no sobrenadante ao utilizar Luminex tal como descrito acima. Os pacientes 1-3 apresentaram teste de 20 Quantiferon negativo os pacientes 4-6 apresentaram teste de Quantiferon positivo.

Conforme observado na tabela 3, todos os pacientes, apesar da imunossupressão, montaram níveis elevados de IP-10 em resposta ao controle de mitógeno positivo. Os níveis 25 elevados de IP-10 estimulado por ESAT6 (faixa de 668 - 2.800 pg/ml) foram observados em todos os pacientes com TB latente (teste Quantiferon positivo). Concluindo, o teste baseado em IP-10 pode ser utilizado para o diagnóstico da infecção de TB latente nos pacientes com imunossupressão.

30 Tabela 3

Paciente	Teste QFT	Nil	ESAT6	Mitógeno
1	-	35	184	1.141
2	-	87	95	2.800
3	-	38	47	2.800

4	+	34	2.800	1.589
5	+	63	1.605	2.800
6	+	31	668	1.393

Tabela 3. Seis pacientes com artrite reumatóide foram estimulados com Nil, Esat-6 (um dos antígenos utilizados no teste de Quantiferon), ou mitógeno, o IP-10 foi medido por Luminex. Os três pacientes de cima apresentaram teste de Quantiferon negativo e os três de baixo apresentaram teste Quantiferon positivo. Todos os pacientes estão livres de sintomas ativos da doença de TB mas sofrendo e sob medicação imunossupressora maciça para RA grave (candidatos a tratamento biológico, isto é, bloqueadores de TNF- α).

10 Exemplo 7

Ip-10 como marcador para TB latente em pessoas saudáveis com exposição a TB conhecida na juventude

Duas pessoas do teste (RV e AKA) com exposição a TB conhecida na juventude, conversão provada de PPD e sem nenhuma quimioprofilaxia de tuberculose e nenhuma comorbidez, foram testadas quanto à resposta a IP-10 ao utilizar o método descrito acima. Os doadores foram conhecidos como Quantiferon positivos dos testes precedentes. Ambas as pessoas do teste reagiram com fortes respostas a IP-10 específico de antígeno (ESAT-6) (302,9 pg/ml e 916,1 pg/ml) indicados na tabela 9. A pessoa do teste RV foi testada duas vezes com um intervalo de dois meses, e há uma boa reprodução dos resultados (dados não mostrados).

25 Conclusão: O Ip-10 é forte como marcador para a infecção de tuberculose latente.

Tabela 4

Paciente	Teste QFT	Nil	Ag (apenas estimulação com ESAT6)	Mitógeno
AKA	+	22,5	325,4	631
RV	+	10,4	926,5	491,5

Tabela 4. Dois pacientes saudáveis com exposição a TB conhecida na juventude são testados quanto á resposta ao antígeno da tuberculose (ESAT6).

Exemplo 8

5 O nível de IP-10 espontâneo em uma amostra em combinação com a liberação de IP-10 específico de antígeno pode distinguir indivíduos saudáveis com ou sem infecção de Tb latente TB dos pacientes com TB ativa

No exemplo 6 (tabela 3) foi mostrado que os níveis
 10 de IP-10 espontâneo (Nil) são baixos em ambos os pacientes infectados latentemente com tuberculose 34 pg/ml (faixa: 31 - 63 pg/ml)) e não-infectados (38 pg/ml (faixa: 35 - 87 pg/ml)) com artrite reumatóide. Estes níveis estavam a um nível
 15 similarmente baixo tal como aquele observado em doadores saudáveis não-infectados (27,1 pg/ml (faixa: 17,7 - 140,6 pg/ml), tabela 1) e doadores latentemente infectados (22,5 e 10,4 pg/ml), tabela 4). Se todos os pacientes sem tuberculose
 20 ativa fossem agrupados e comparados estes níveis baixos aos níveis elevados da liberação de IP-10 espontânea observados nos pacientes com TB ativa (150,9 pg/ml (faixa: 61,1 - 991,9)) (tabela 1), é encontrada uma diferença altamente
 significativa ($p < 0,0001$, Mann Whitney).

Concluindo, a combinação da liberação de IP-10
 25 espontânea e específico de antígeno pode ser utilizada para discriminar entre a infecção ativa e latente da tuberculose.

Exemplo 9

A diluição de amostras de plasma pode ser feita sem perder a
 sensibilidade do teste de IP-10

A diluição da amostra é uma diminuição por etapas
 30 das concentrações pela adição de uma solução diluente. Foi testado se a diluição de uma amostra do plasma após a incubação interferia na relação multiplicada entre amostras do plasma com concentrações de IP-10 elevadas e baixas, e se

esta diluição interferia na sensibilidade do ensaio de IP-10. As amostras foram diluídas na diluição de ensaio fornecida no kit Biosource Luminex.

Conforme observado na tabela 5, a diluição das amostras resulta em uma diminuição por etapas dos níveis de IP-10 no plasma e no sangue integral estimulado por antígeno e mitógeno de sangue integral não-estimulado (Nil).

Tabela 5

	Fator de diluição	IP-10	
		Paciente A	Paciente B
Nil	1:2	22,5	10,4
	1:4	11,7	5,2
	1:8	4,4	2,9
	1:16	1,3	1,3
Antígeno	1:2	631	491
	1:4	430	327
	1:8	396	197
	1:16	277	130
Mitógeno	1:2	325	927
	1:4	225	541
	1:8	139	438
	1:16	89	326

Tabela 5. O plasma do sangue integral estimulado por Nil, antígeno e mitógeno foi diluído 1:2-1:16 na diluição de ensaio e analisado quanto aos níveis de IP-10 ao utilizar Luminex. Na tabela 5 é observado que a concentração de IP-10 específico de antígeno permanece muito alta até mesmo nas amostras diluídas 16 vezes (275 pg/ml e 128 pg/ml).

A figura 4 apresenta os dados de sete controles e oito pacientes com tuberculose testados quanto às respostas a IFN- γ específico de antígeno e a IP-10. A produção de IP-10 específico de antígeno é medida depois da diluição 1:8 vezes da amostra e a resposta a IFN- γ é medida na amostra não diluída. Outra vez foram verificados valores de IP-10 altamente específicos, indicando que o IP-10 é um forte marcador para a infecção de M. tuberculosis ($p = 0,0003$) até mesmo na diluição de 1:8 vezes. Além disso, os valores de IP-

10 diluído 1:8 vezes (média de 1.097 pg/ml (faixa: 225 -
3.045 pg/ml)) são mais elevados em comparação ao IFN- γ
analisado no material de amostra não diluído (média de 269
pg/ml (faixa: 81 - 1.273 pg/ml)) $p = 0,014$ (teste de pares
5 combinados de Wilcoxon).

Estes resultados demonstram que o IP-10 é um
marcador muito robusto para um ensaio de diagnóstico e que o
teste de IP-10 pode ser utilizado em uma configuração de
teste onde o material da amostra é muito escasso. Isto abre
10 uma gama completa de aplicações de teste de IP-10, onde a
amostra pode ser diluída (tanto antes quanto depois da
incubação) nos casos onde somente um material de amostra
muito pequeno está disponível (diretamente aplicável, por
exemplo, em um produto comercial para bebês com um volume
15 muito baixo de sangue).

Conclusão: É demonstrado que as amostras de plasma
podem ser diluídas sem perder a sensibilidade do teste de IP-
10.

Exemplo 10

20 O IP-10 é mais sensível do que o IFN- γ e melhora no
diagnóstico in vitro da infecção por tuberculose

Para verificar se o IP-10 tinha o potencial para
melhorar a sensibilidade do teste de QFT-IT atual, foram
testadas as respostas a IP-10 em pacientes de tuberculose com
25 resultados de teste de QFT-IT negativos ou indeterminados,
(quanto às características dos pacientes e as medições
individuais, vide a tabela 6). Estes pacientes eram, em
outras palavras, falsos-negativos no teste de IFN- γ . A figura
5 mostra as respostas a IP-10 e IFN- γ específico de antígeno
30 em sete pacientes com TB e um teste de QFT-IT negativo ou
indeterminado. As respostas a IFN- γ específico de antígeno,
determinadas por QFT-IT ELISA, variaram de 0 a 12,8 pg/ml, ao

passo que as respostas a IP-10 específico de antígeno variaram de 0 a 532 pg/ml. Dos sete pacientes, três também não eram responsivos a IP-10 com uma resposta específica de antígeno abaixo de 10 pg/ml, ao passo que os outros quatro

5 pacientes responderam com um nível de IP-10 médio de 318 pg/ml (faixa: 196-532 pg/ml). Dos quatro pacientes com um teste de QFT-IT negativo e resposta a IP-10 positiva, dois estavam co-infectados por HIV com uma contagem de células CD4 de 32 células/ μ l e 300 células/ μ l, respectivamente. A

10 liberação de IP-10 específico de mitógeno era elevada em todos os doadores, variando de 394 a 2.800 pg/ml. Estas descobertas surpreendentes são a base da sensibilidade aumentada de IP-10 com base nos testes in vitro comparados aos testes baseados em IFN- γ .

15 Tabela 6

Doa dor n°.	País	Idade (anos)	Diagnóstico	Microscopia/cultura	HIV	CD4 (células/ μ l)	IFN- γ (pg/ml) ^c			Resultado do QFT-IT ^b	IP-10 ^a (pg/ml) ^c			Resultado de IP-10 ^a
							Solução salina	Antígenos	Mitógeno		Solução salina	Antígenos	Mitógeno	
1	GB	50	pTB	+/n.d.	pos.	300	8	7	32	neg.	72	383	520	pos.
2	GB	45	pTB	+/n.d.	pos.	333	13	13	596	neg.	97	106	757	neg.
3	GB	50	pTB	+/n.d.	pos.	n.d.	7	10	1.446	neg.	98	107	2.800	neg.
4	DK	39	pTB	+/+	pos.	767	3	2	1.051	neg.	29	39	2.800	neg.
5	DK	36	pTB	+/+	neg.	n.d.	38	44	249	neg.	716	1.040	2.800	pos.
6	DK	41	pTB	+/+	n.d.	n.d.	7	20	291	neg.	31	227	556	pos.
7	DK	26	epTB	+/+	pos.	32	20	28	30	ind. ^b	301	834	394	pos.

Tabela 6. Pacientes com TB ativa e resultado de teste de QFT-IT negativo ou indeterminado foram testados quanto à resposta a IP-10.

20 ^a GB - Guiné Bissau; DK - Dinamarca

^b pTB - TB pulmonar, epTB - TB extra-pulmonar

^c O sangue integral foi estimulado por 20-24 horas com solução salina e antígenos específicos de M. tuberculosis

(ESAtt-6, CFP10, e TB 7.7) ou mitógeno (PHA). A produção de citocina foi medida por ELISA (IFN- γ) e multiplex (IP-10).

^d Uma resposta de QFT-IT positiva foi definida como uma resposta específica de antígeno de 17,5 pg/ml acima de Nil de acordo com as diretrizes do fabricante.

^e Uma resposta a IP-10 positiva foi definida como uma resposta a IP-10 específico de antígeno de 36 pg/ml acima de Nil baseado arbitrariamente nos resultados médios de onze controles saudáveis + três desvios padrão (pacientes do exemplo 4)

^g n.d. - não feito

^h indeterminado

Exemplo 11

As respostas a IP-10 específico de antígenos fortes podem ser geradas em incubação curta e longa

Na tabela 7 são apresentadas as respostas não-estimulada e estimulada por antígeno de um paciente típico de TB examinado 6-120 horas após a incubação. Conforme pode ser observado na tabela 7, é possível induzir as respostas a IP-10 com estimulação do antígeno, em um tempo muito curto de incubação. > 1ng é produzido em seis horas e as respostas muito elevadas 3-6ng são mantidas durante 120 horas de incubação. Estas descobertas demonstram que o desempenho do teste de IP-10 é muito robusto e pode ser executado em tempos de incubação muito curtos (< 6 horas) e muito longos.

Tabela 7

Tempo horas	IP-10 (pg/ml)	
	Solução salina	Antígeno
6	93	1.173
12	117	3.467
24	93	5.467
48	96	5.867
120	80	6.130

Tabela 7. Respostas não-estimuladas (solução salina) e estimuladas por antígeno de um paciente típico de TB examinado 6-120 horas após a incubação.

Exemplo 12

5 As respostas a IP-10 específico de antígeno fortes podem ser geradas em uma gama de temperaturas de incubação

Conforme pode ser observado na tabela 8, é possível induzir as respostas a IP-10 com estimulação de antígeno na faixa ampla de temperaturas. > 200 pg/ml de IP-10 específico de antígeno é produzido a 30°C, indicando que a incubação
10 abaixo de 30°C é possível, e que a incubação a temperaturas na faixa, por exemplo, de 30 a 37°C, irá gerar respostas específicas de antígenos fortes.

Tabela 8

Temperatura (°C)	Solução salina	Antígenos
20,0	8	6
30,0	4	221
37,0	5	852

15 Tabela 8. Respostas não-estimulada e estimuladas por antígeno de um paciente típico de TB examinado 24 horas após a incubação a 20-37°C. Os valores de IP-10 são em pg/ml.

Exemplo 13

Quantidades pequenas de sangue integral podem ser diluídas
20 antes da incubação e ainda gerar fortes respostas a IP-10

Amostras de 1 ml (1:0), 0,5 ml (1:1) e 0,1 ml (1:10) de sangue integral foram diluídas em RPMI-1640 até um volume total de 1 ml. O sangue integral diluído foi
estimulado em tubos de QFT-IT por 24 horas. Os valores não
25 são corrigidos para o fator de diluição. Conforme pode ser observado na tabela, 9 é possível diluir o sangue integral em RPMI-1640 antes da incubação e gerar ainda respostas a IP-10 específico de antígenos > 80 pg/ml. Isto indica que uma diluição adicional é possível e um kit de teste utilizando

quantidades muito pequenas de sangue ou células pode ser desenvolvido.

Tabela 9

Diluição	N	A
1:0	93	5.467
1:1	40	2.933
1:10	13	93

5 Tabela 9. Respostas não-estimuladas e estimuladas por antígeno de um paciente típico de TB ao utilizar alíquotas pequenas de sangue integral diluídas em RPMI-1640. Os níveis de IP-10 são em pg/ml.

Exemplo 14

Estabilidade de IP-10 a 25°C

10 Alíquotas de plasma de sangue integral estimulado por PHA de quatro doadores foram armazenadas a 25°C por ½ hora, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas ou 24 horas antes da análise. Na tabela 10 fica evidente que o IP-10 é uma molécula muito estável que não desintegra nem mesmo em 24
15 horas a 25°C.

Tabela 10

Tempo a 25°C	Doador 1	Doador 2	Doador 3	Doador 4
0 hora	63	769	482	127
½ hora	57	649	471	115
1 hora	72	754	461	116
2 horas	68	728	438	115
4 horas	62	727	487	126
8 horas	66	693	459	137
24 horas	77	763	455	149

Tabela 10. Estabilidade da IP-10 a 25°C (as medidas são em pg/ml).

Exemplo 15

20 Estabilidade de IP-10 a 5°C.

Alíquotas de plasma de sangue integral estimulado por PHA de quatro doadores foram armazenadas a 5°C por 12 horas, 24 horas, 72 horas, 144 horas ou 216 horas (nove dias) antes da análise. Na tabela 11 é evidente que o IP-10 é uma

molécula muito estável que não desintegra nem mesmo em 216 horas (nove dias) a 5°C.

Tabela 11

Tempo a 5°C	Doador 1	Doador 2	Doador 3	Doador 4
0 hora	63	769	482	127
12 horas	71	646	Faltando	134
1 dia	69	664	501	144
3 dias	78	784	539	166
6 dias	81	883	495	187
9 dias	93	728	520	183

Tabela 11. Estabilidade de IP-10 a 5°C.

5 Exemplo 16

Estabilidade de IP-10 em ciclos de congelamento e descongelamento

Alíquotas de plasma de sangue integral estimulado por PHA de quatro doadores foram congeladas (-80°C) e descongeladas até cinco vezes antes da análise. Na tabela 12 é evidente que o IP-10 é uma molécula muito estável ao congelamento/descongelamento que não desintegra nem mesmo em ciclos de cinco vezes de congelamento-descongelamento.

Tabela 12

Ciclos de congelamento - descongelamento	Doador 1	Doador 2	Doador 3	Doador 4
0	63	769	482	127
1 vez	66	879	388	131
2 vezes	74	793	513	122
3 vezes	70	795	486	126
4 vezes	65	952	459	126
5 vezes	80	746	483	142

15 Tabela 12. Estabilidade de IP-10 ao congelamento-descongelamento

Exemplo 17

O IP-10 como um biomarcador de diagnóstico é independente de plataforma.

20 Os níveis de IP-10 não são apenas mensuráveis ao utilizar Luminex, no exemplo 17 foram medidas as amostras de

quatro pacientes com TB e de quatro controles saudáveis ao utilizar a tecnologia de ELISA (Biosource).

Conforme pode ser apreciado na tabela 13, todos os quatro pacientes produzem IP-10 específico de antígeno acima de 457 pg/ml, ao passo que todos os controles produzem IP-10 abaixo de 13 pg/ml.

Tabela 13

	Ip-10 específico de antígeno (pg/ml)
Controle 1	9
Controle 2	13
Controle 3	0
Controle 4	0
Paciente 1	457
Paciente 2	626
Paciente 3	719
Paciente 4	620

Tabela 13. Produção de IP-10 específico de antígeno de quatro controles e quatro pacientes medida por tecnologia de ELISA.

10 Exemplo 18

Combinação de medições de IP-10 e outros biomarcadores conhecidos para criar um marcador combinado mais forte, e para aumentar o número daqueles que respondem positivamente

Por razões desconhecidas, alguns indivíduos respondem fortemente com um biomarcador e um não com um outro depois do estímulo de antígeno. Por exemplo, alguns indivíduos não podem mostrar respostas a IP-10 nem a IFN- γ , ou só produzem níveis baixos de IP-10 ou IFN- γ . Neste caso, a medição simultânea de dois, três, quatro ou mais biomarcadores irá aumentar a sensibilidade do ensaio e aumentar o número daqueles que respondem positivamente. Com a combinação de IP-10 e, por exemplo, medições de IFN- γ , portanto, é possível fazer as predições de diagnóstico que são menos vulneráveis à energia do biomarcador simples.

25 Uma abordagem para esta estratégia de biomarcadores combinados é observada na tabela 15 onde os resultados de IP-

10 e de Quantiferon da tabela 6 são combinados na seguinte matriz: se o paciente reage positivamente a pelo menos um dos testes, o paciente é então considerado como infectado. No exemplo apresentado não há ninguém respondendo negativamente a QFT-IT que seja positivo pelo teste de IP-10.

Tabela 14

Paciente número	Resultado de QFT-IT	Resultado de IP-10	Resultado combinado de QFT-IT/IP-10
1	neg.	pos.	pos.
2	neg.	neg.	neg.
3	neg.	neg.	neg.
4	neg.	neg.	neg.
5	neg.	pos.	pos.
6	neg.	pos.	pos.
7	ind.	pos.	pos.

Tabela. Os resultados de teste de QFT-IT e IP-10 são combinados e interpretados como se um paciente fosse positivo por pelo menos um teste e então o paciente é considerado como infectado. O ponto de corte para o teste de IP-10 foi definido como uma resposta a IP-10 específico de antígeno de 36 pg/ml acima do Nil, baseada arbitrariamente nos resultados médios de onze controles saudáveis + três desvios padrão (pacientes do exemplo 4).

15 Um outro método mais complexo de construção de um biomarcador combinado é visto na tabela 16. As respostas de IP-10 e IFN- γ específico de antígeno são combinadas pela adição e pela multiplicação. Sete controles não-expostos e oito pacientes com TB ativa foram avaliados. Na tabela 14 pode ser visto o número médio e a faixa de respostas a IP-10 e IFN- γ específico de antígeno; e o número médio e a faixa de respostas a IP-10 e IFN- γ adicionadas e multiplicadas. Pela adição, o afastamento entre o controle de resposta mais elevada e o paciente de resposta mais baixa é aumentado de 62 pg/ml para IFN- γ , e 1.727 pg/ml para IP-10, para 1.863 pg/ml, e pela multiplicação para 164.642 (pg/ml)². Este aumento

intenso surpreendente na extensão pela multiplicação também aumentou a diferença multiplicada relativa baseada na média para uma multiplicação surpreendente de 379.274, isto é, em comparação ao IP-10 específico de antígeno que teve 5 diferenças de 619 vezes entre os pacientes e os controles, ou o IFN- γ que teve uma diferença de 1.074 vezes.

Tabela 15

		IP-10 específico de antígeno	IFN- γ específico de antígeno	Adição	Multiplicação
Controles N = 7	Média	0	0	2	2
	Mín.	0	0	0	0
	Máx.	63	2	62	62
Pacientes N = 8	Média	8.779	215	9.074	2.019.761
	Mín.	1.800	64	1.865	164.704
	Max.	24.355	1.018	25.373	25.146.884

Tabela 15. IP-10 específico de antígeno e IFN- γ específico de antígeno foram adicionados ou multiplicados para construir um 10 biomarcador combinado de IP-10/IFN- γ . As medições específicas de antígenos < 0 foram normalizadas em 0.

Exemplo 19

Diagnóstico de infecção por Chlamydia trachomatis ao utilizar o ensaio de IP-10

15 PBMCs foram isoladas de sete pacientes com infecção por Chlamydia trachomatis e de sete doadores com nenhum histórico de infecção por Chlamydia registrado. As PBMCs foram estimuladas em uma cultura de cinco dias e os sobrenadantes foram analisados quanto à produção de IP-10 ao 20 utilizar luminex e quanto à produção de IFN- γ ao utilizar ELISA.

Na tabela 16 é observado que os níveis elevados (> 0,5 ng/ml) do sobrenadante da cultura de PBMC IP-10 são induzidos pela estimulação com o antígeno de extrato de 25 serovar D de Chlamydia trachomatis pacientes que sofrem de infecção genital por Chlamydia trachomatis. É evidente que

alguns controles respondem a esta estimulação não-específica, mas que os níveis são mais baixos. Há uma elevada produção de IP-10 específico de antígeno > 0,5 ng/ml.

Concluindo, o IP-10 é um novo biomarcador de diagnóstico para a infecção por Chlamydia.

Tabela 16

Controles	IP-10 (pg/ml)			IFN- γ (pg/ml)		
	Nil	Ag	Específico de Ag	Nil	Ag	Específico de Ag
Controle 01	0	252	252	128	2.184	2.056
Controle 10	45	14	-31	148	146	-2
Controle 18	226	820	594	0	474	474
Controle 20	282	998	716	4	2.514	2.510
Controle 25	66	1.240	1.175	30	296	266
Controle 28	0	2	2	40	112	72
Controle 31	10	4	-6	84	162	78
Média	45	252	252	40	296	266
Pacientes						
Paciente 01	14	2.472	2.458	0	7.808	7.808
Paciente 03	2	1.449	1.446	84	2.976	2.892
Paciente 04	498	3.725	3.227	10	8.206	8.196
Paciente 05	13	1.317	1.304	36	7.516	7.480
Paciente 12	21	4.707	4.686	0	10.214	10.214
Paciente 18	1	503	502	4	6.264	6.260
Paciente 02	58	1.680	1.621	10	4.016	4.006
Média	14	1.680	1.621	10	7.516	7.480

Tabela 16. Os níveis de Nil, antígeno e específicos de antígenos de IP-10 e IFN- γ foram induzidos em cultura de PBMC de cinco dias.

Referências

Abramo C, Meijgaarden KE, Garcia D, Franken KL, Klein MR, Kolk A] et al.

5 Monokine induced by interferon gamma and IFN-gamma response to a fusion protein of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 in Brazilian tuberculosis patients. Microbes

Bourgarit, A., G. Carcelain, V. Martinez, C. Lascoux, V. Delcey, B. Gicquel, E. Vicaut, P. H. Lagrange, D. Sereni, and B. Autran. 2006. Explosion of tuberculin-specific Thi-

10 responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. AIDS 20: F1-F7.

Hughes, A. J., P. Hutchinson, T. Gooding, N. J. Freezer, S. R. Holdsworth, and P. D. Johnson. 2005. Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection using ESAT-6 and

15 intracellular cytokine cytometry. Clin. Exp. Immunol. 142:132-139.

Pai, M., R. Joshi, S. Dogra, D. K. Mendiratta, P. Narang, S. Kalantri, A. L. Reingold, J. M. Colford Jr, L. W. Riley, and D. Menzies. 2006. Serial Testing of Health Care Workers for

20 Tuberculosis using Interferon- γ Assay. Am. J. Respir. Crit Care Med.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO IMUNOLÓGICO, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

a) incubação de uma amostra obtida de um mamífero com pelo menos um antígeno de teste;

b) determinação do nível de IP-10 na dita amostra;

c) comparação do nível de IP-10 determinado com um nível de referência, determinando desse modo se o dito mamífero encontrou previamente pelo menos um antígeno de teste que gera reatividade imunológica ao(s) dito(s) antígeno(s) de teste ou encontrou previamente outros antígenos que geram retro-reatividade imunológica ao(s) antígeno(s) de teste.

2. MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR UMA INFECÇÃO, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de

a) incubação de uma amostra obtida de um mamífero com pelo menos um antígeno de teste, contanto que o dito antígeno de teste não seja PPD;

b) determinação do nível de IP-10 na dita amostra;

c) comparação do nível de IP-10 determinado com um nível de referência, determinando desse modo se o dito mamífero está infectado com um microorganismo;

d) determinação se o dito mamífero está infectado se o nível de IP-10 determinado estiver acima do nível de referência.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a amostra é dividida em pelo menos duas frações, e

a) incubação da primeira fração da amostra com o antígeno de teste para gerar uma amostra de resposta;

b) incubação da segunda fração da amostra com uma solução inativa para gerar uma amostra nula;

c) determinação do nível de IP-10 nas duas frações;

d) determinação da resposta de IP-10 dependente de antígeno da amostra ao subtrair o nível de IP-10 determinado na amostra nula do IP-10 determinado na amostra de resposta;

e) comparação da resposta de IP-10 dependente de antígeno ou um valor derivado da mesma com o nível de referência ou um valor derivado do mesmo, desse modo determinando se o mamífero encontrou previamente o antígeno de teste e desse modo gerando reatividade imunológica ao antígeno de teste ou se encontrou previamente outros antígenos gerando retro-reatividade imunológica ao antígeno.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente a divisão da amostra em três frações e a incubação da terceira fração da amostra com um ativador de células T para gerar um controle positivo.

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizado pelo fato de que uma resposta de IP-10 dependente de antígeno acima do nível de referência juntamente com uma nula indica que o mamífero tem uma infecção ativa, uma infecção latente, uma infecção recente, e/ou uma infecção latente de longa duração.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, caracterizado pelo fato de que a infecção é ou foi causada por um microorganismo.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado do grupo que consiste em Mycobacteria, Leishmaniasis, Clamydia, Trypanosomiasis e Schistosomiasis.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a Mycobacteria pertence aos organismos complexos de M. tuberculosis (M. tuberculosis, M. bovis e M. africanum), e Mycobacteria onde a região de diferença (RD1) não foi deletada (M. kansasii, M. szulgai,

M. marinum, M. flavescens, M. gastrii) ou Mycobacteria patogênica aos seres humanos (M. avium, M. lepra ou outra Mycobacteria que não da tuberculose).

9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que as Mycobacteria é M. tuberculosis.

10. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dito antígeno de teste é selecionado do grupo que consiste nos antígenos ESAT-6, CFP-10, TB7.7, AG 85, HSP 65 e RD-1.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é Chlamydia.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a Chlamydia é selecionada do grupo que consiste em C. trachomatis, C. Pneumonia, C. psittaci, C. muridarum e C. suis.

13. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que o antígeno é selecionado do grupo que consiste no extrato de Serovar D, na proteína de membrana externa principal (MOMP), proteínas de membrana externa ricas em cisteína (OMPs), OMP2, OMP3, OMPs polimórficas (pOMPs), difosfato de adenosina/translocase de trifosfato de adenosina de Chlamydia pneumonia, proteínas de porina B (PorBs), e CT521.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é Leishmania.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é Trypanosoma.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é Schistosoma.

17. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a amostra é derivada de sangue.

18. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente

a) a determinação do nível de MCP-1 em resposta à estimulação antigênica, b) a combinação do nível determinado de IP-10 e de MCP-1, e

c) a comparação do dito nível combinado com um nível de referência combinado.

19. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente

a) a determinação do nível de IL-2 em resposta à estimulação antigênica,

b) a combinação do nível determinado de IP-10 e de IL-2, e

c) a comparação do dito nível combinado com um nível de referência combinado.

20. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente

a) a determinação do nível de INF- γ e opcionalmente de MCP-1 e/ou de IL-2 em resposta à estimulação antigênica,

b) a combinação do nível determinado de IP-10 e de INF- γ e opcionalmente de MCP-1 e/ou de IL-2, e

c) a comparação do dito nível combinado com um nível de referência combinado.

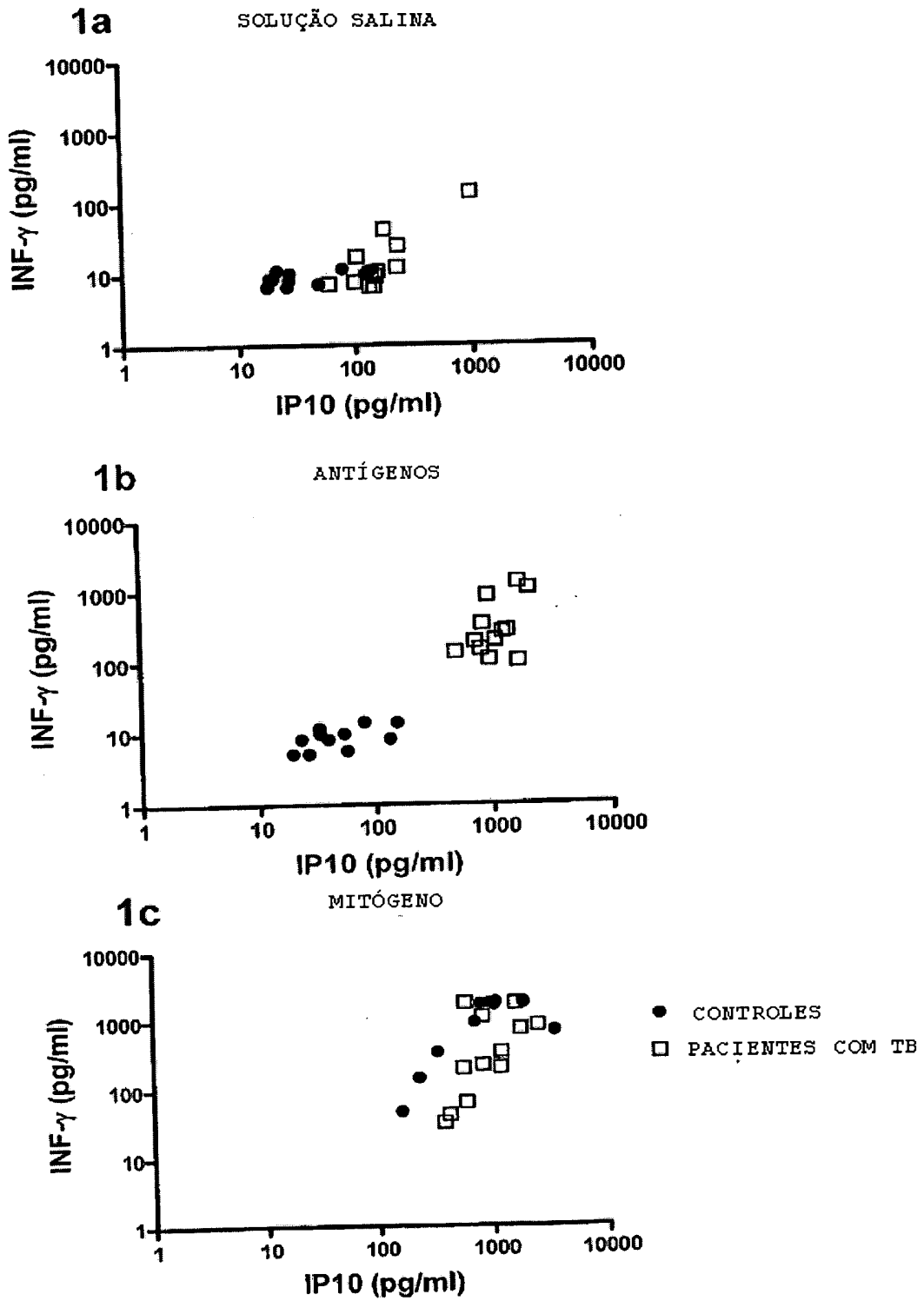


Fig. 1

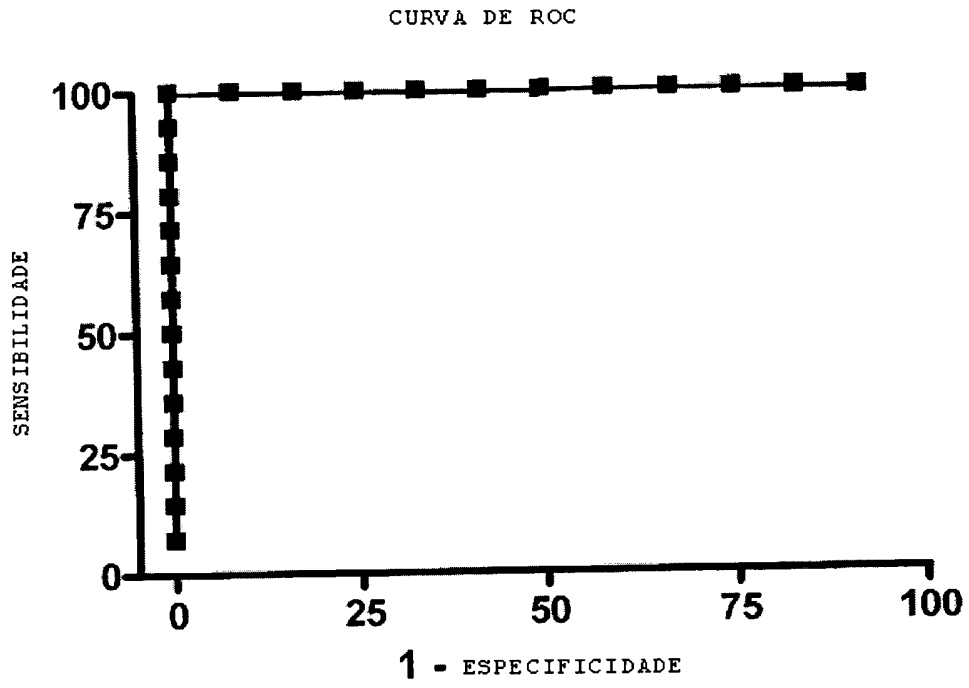


Fig. 3

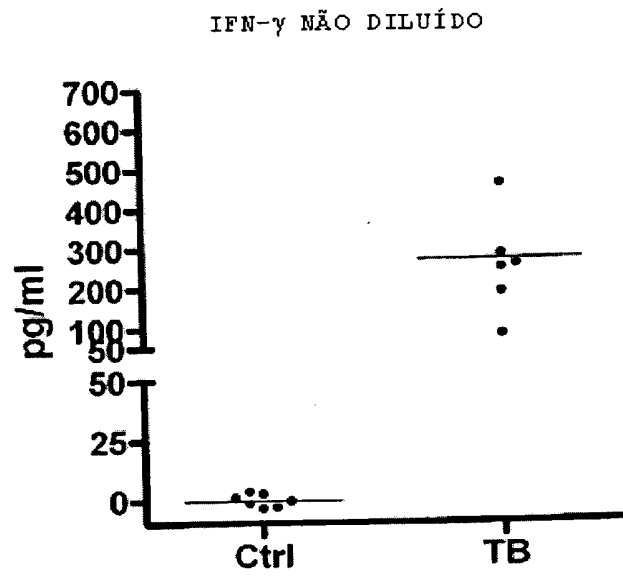
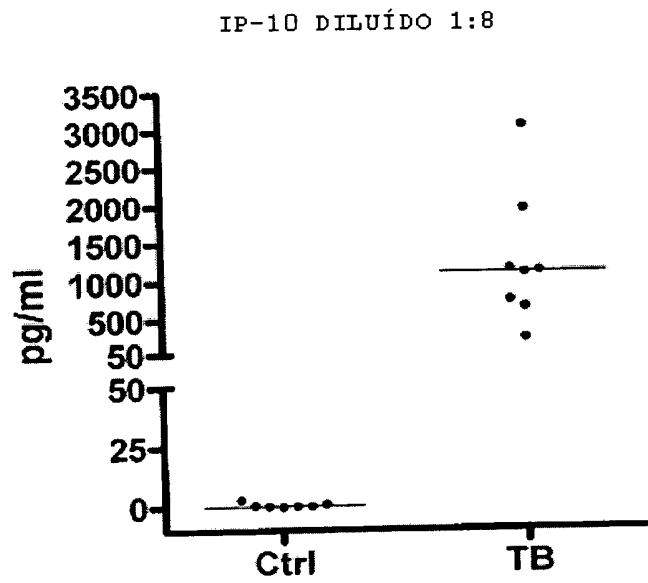


Fig. 4

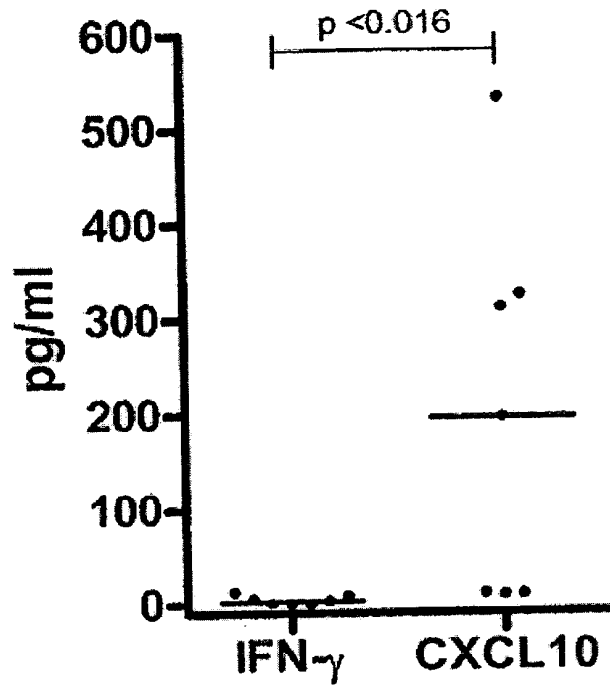


Fig. 5

RESUMOMÉTODO IMUNOLÓGICO E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR UMA
INFECÇÃO

A presente invenção refere-se a um método
5 imunológico e, mais particularmente, a um método para medir a
reatividade imunológica medida por células (CMI) nos
mamíferos com base na produção de IP-10. A invenção também
apresenta um ensaio e um kit para medir a CMI para um
antígeno utilizando sangue integral ou outras amostras
10 biológicas apropriadas. Os métodos da presente invenção são
úteis em protocolos terapêuticos e de diagnóstico para o ser
humano, animais domésticos e aplicações veterinárias e da
vida selvagem, e desse modo a invenção também se refere a um
método para diagnosticar uma infecção em um mamífero.