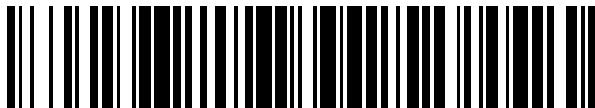




OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 677 944**

⑮ Int. Cl.:
G01N 33/68
(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2010 PCT/US2010/003052**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11065976**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2010 E 10795488 (5)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2504706**

④ Título: **Detección de infección intraamniótica**

⑩ Prioridad:

**25.11.2009 US 264633 P
07.07.2010 US 362192 P**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.08.2018

⑪ Titular/es:

**HOLOGIC INC. (100.0%)
250 Campus Drive
Marlborough, MA 01752, US**

⑪ Inventor/es:

**LADERMAN, ELIZABETH, INMAN y
GROVE, THOMAS, H.**

⑪ Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 677 944 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de infección intraamniótica

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a ensayos para el diagnóstico y/o evaluación del riesgo de infección intraamniótica (IAI) en mujeres embarazadas. La presente divulgación se refiere adicionalmente a ensayos, algoritmos de diagnóstico, biomarcadores, materiales, métodos y dispositivos relacionados con el uso de biomarcadores para el diagnóstico de infección intraamniótica en un sujeto mamífero de sexo femenino en estado de embarazo y proporcionar sistemas de ensayo diagnóstico para tal diagnóstico, así como diversas otras realizaciones tal como se describen en el presente documento.

10 **Antecedentes**

15 El nacimiento prematuro es la causa principal de muerte en el primer mes de vida y un factor contribuyente en más de un tercio de todas las muertes infantiles. La infección intraamniótica (IAI) es una de las causas principales del nacimiento prematuro idiopático a las <37 semanas de gestación. Otras afecciones asociadas con el nacimiento prematuro incluyen parto prematuro, ruptura prematura de membranas, preeclampsia, desprendimiento placentario, 20 placenta previa, retraso del crecimiento fetal, volumen de fluido amniótico excesivo o inadecuado, anomalías fetales, hemorragia intrauterina, diabetes, abuso de fármacos y estrés. El tratamiento de parto prematuro y nacimiento prematuro puede incluir el tratamiento con agentes tocolíticos y corticosteroides para la maduración pulmonar fetal, si se indica. Pueden prescribirse antibióticos de espectro reducido para la cobertura de estreptococos del Grupo B a la espera de resultados de cultivo negativos.

25 La IAI es una de las causas más importantes de parto prematuro idiopático y nacimiento prematuro. La IAI es una invasión microbiana de la cavidad amniótica y se produce en el 10 -15 % de todos los casos de parto prematuro. (Newton ER. Clin Obstet Gynecol 1993;36(4):795-808; Watts DH, et al., Obstet Gynecol 1992;79:351-7; Romero R, et al., Am J Obstet Gynecol 1993;169:805-16; Hillier SL, et al., Obstet Gynecol 1993;81:941-8). Otros términos que 30 se usan para describir la IAI con o sin membranas intactas incluyen: infección de fluido amniótico, amnionitis y corioamnionitis clínica. Además del papel de la IAI como una causa de parto prematuro, la IAI también está asociada con morbilidad y mortalidad neonatal aumentada, particularmente entre neonatos prematuros. En general, se ha observado un aumento de tres a cuatro veces en la mortalidad perinatal entre neonatos con nacimiento de bajo peso nacidos de madres con IAI. También hay aumentos en síndrome de dificultad respiratoria, hemorragia 35 intraventricular y sepsis neonatal. (Morales, W.J. Obstetrics and Gynecology 70:183, 1987). La IAI ha estado independientemente implicada en leucomalacia periventricular neonatal y parálisis cerebral; los riesgos de daño de materia blanca cerebral y parálisis cerebral son nueve veces superiores en el marco de IAI. (Bejar,R., et al., Am.J.Obstet.Gynecol. 159:357, 1988; Grether,J.K. and Nelson,K.B. JAMA 278:207, 1997).

40 La mayoría de los casos de IAI, del 80 % al 90 %, son subclínicos (asintomáticos) distintos del parto prematuro. Actualmente, el tratamiento de parto prematuro idiopático incluye la observación, tratamiento con agentes tocolíticos y posible confirmación de IAI mediante amniocentesis y cultivo. El cultivo de fluido amniótico solo subestima la verdadera prevalencia de IAI debido a la presencia de microorganismos no aptos para el cultivo, dificultad en el aislamiento de microorganismos delicados y terapia antibiótica previa (Romero, R. et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 45 161:817, 1989). Un ensayo de IAI positivo o la presente divulgación proporcionaría un complemento útil para los diagnósticos actuales y régimen de tratamiento disponibles para el clínico. El diagnóstico preciso de IAI es importante para el tratamiento apropiado de la madre con antibióticos dirigidos, denegando la terapia tocolítica que está contraindicada en la IAI así como anticipando la ubicación del parto para la madre y el nivel necesario de cuidado para el lactante que puede ser muy prematuro y enfermo como una consecuencia en exceso de la IAI.

50 55 Un ensayo de IAI negativo de la presente divulgación proporciona la seguridad de que la etiología del parto prematuro puede ser de orígenes distintos a la infección. Un ensayo negativo, junto con la observación 30 de otras señales y/o síntomas, permite al médico tratar el parto prematuro.

55 **Patogénesis y factores de riesgo:** La infección intraamniótica se produce como resultado de una infección ascendente por microorganismos del tracto genital inferior. La prevalencia de la IAI tiene una fuerte correlación inversa con la edad gestacional. (Watts DH, et al., Obstet Gynecol 1992;79:351-7). Las bacterias indígenas al tracto genital inferior se recuperan del fluido amniótico del 10-20 % de todas las mujeres en parto prematuro con membranas amnióticas intactas sin signos clínicos de IAI (Romero R, et al., Ann N Y Acad Sci 1991;622:355-75) y en hasta un 67 % de las mujeres en parto prematuro con embarazo que terminan a las 23-24 semanas de gestación. (Watts DH, et al., Obstet Gynecol 1992;79:351-7). Además, estas observaciones están respaldadas por la corioamnionitis histológica que se ha encontrado en un 60-90 % de las gestaciones que finalizan entre las 20 y 24 semanas. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la IAI es una causa importante de parto prematuro idiopático, especialmente en edades gestacionales tempranas.

60 65 **Diagnóstico:** Un diagnóstico de IAI temprano permitiría el tratamiento e intervención a tiempo. Sin embargo, hay

- múltiples problemas en la realización del correcto diagnóstico. Desde el punto de vista clínico, el diagnóstico temprano resulta problemático puesto que los signos y síntomas clínicos de la IAI aparecen tarde en el transcurso de la infección y son, en general, no específicos. Los criterios clínicos usados comúnmente para diagnosticar la IAI incluyen parto prematuro con fiebre materna ($\geq 37,8$ °C), junto con dos o más de los siguientes: leucocitosis materna ($\geq 15.000 /mm^3$), taquicardia materna o fetal, sensibilidad uterina o fluido amniótico fétido. (Gibbs RS, *et al.*, Am J Obstet Gynecol 1980;136(6):709-13). En un estudio por Watts, *et al.*, de mujeres con parto prematuro, no hubo diferencia en la temperatura materna máxima media, recuento de WBC y diferencial entre mujeres con o sin cultivos de fluido amniótico positivo. La IAI subclínica es un término usado para describir una IAI y en la cual los signos y síntomas son mínimos o ausentes en aproximadamente el 88 % de los casos con cultivos de fluido amniótico positivo. (Watts DH, *et al.*, *Obstet Gynecol* 1992;79:351-7). El concepto de IAI subclínica se corrobora adicionalmente por los hallazgos de Gravett, *et al.*, utilizando un modelo de primate no humano. Estos investigadores demostraron que después de una IAI experimental inducida con estreptococos del Grupo B, solo hay fiebre y leucocitosis en un 50 % del tiempo al inicio del parto prematuro inducido con infección, el cual se produce de 28 a 40 horas después de la infección experimental. (Gravett MG, *et al.*, Am J Obstet Gynecol 1994; 171(6): 1660-7).
- Debido a la inconsistencia de características clínicas, se han utilizado otros ensayos de laboratorio complementarios para ayudar en el diagnóstico de IAI. Estos incluyen: medición de proteína C-reactiva materna, examinación directa de fluido amniótico o leucocitos o bacterias sobre tinción de Gram, cultivo de fluido amniótico, medición de concentraciones de glucosa en fluido amniótico, detección de esterasa leucocitaria en fluido amniótico, detección de ácidos orgánicos bacterianos mediante cromatografía gas-líquido, mediciones de diversas citocinas en fluido amniótico (por ejemplo, interleucinas 2, 4, 6, factor estimulante de colonias de granulocitos y factor de necrosis tumoral-alfa), metaloproteinasa-9 de matriz, lactoferrina y evaluación de la actividad fetal (perfil biofísico) mediante ultrasonografía. La medición de citocinas u otros factores bioquímicos resulta costoso, no está clínicamente disponible y es principalmente una herramienta de investigación. Además, la eficacia de evaluación de estos ensayos no ha sido consistentemente mejor que otros ensayos tradicionales fácilmente disponibles tales como tinción de Gram y cultivo de fluido amniótico, concentraciones de glucosa en fluido amniótico y detección de esterasa leucocitaria en fluido amniótico. La eficacia de estos ensayos se ha revisado exhaustivamente anteriormente. (Ohlsson, A. and Wang, E.: An analysis of antenatal tests to detect infection at preterm rupture of the membranes. American Journal of Obstetrics and Gynecology 162:809, 1990). Aunque todos tienen una sensibilidad, especificidad y valor predictivo razonables, ninguno es lo suficientemente sensible o específico para usarse independientemente de las características clínicas en el diagnóstico de IA.
- Por consiguiente, existe una gran necesidad de nuevo enfoques que permitan el diagnóstico temprano y preciso de IAI.
- El documento US 2007/0161125 A1 desvela de identificación de proteomas de fluidos biológicos y su uso en la determinación del estado de afecciones maternas/fetales, incluyendo afecciones maternas de origen fetal, aneuploidías cromosómicas y enfermedades fetales asociadas con el crecimiento fetal y maduración. Se desvela el análisis proteómico de fluido amniótico (FA) y flujo vaginal cervical (FVC), junto con la correlación de cambios en el proteoma normal con diversas afecciones maternas/fetales patológicas, tales como infección intraamniótica, parto prematuro y/o defectos cromosómicos. También se describe identificación de biomarcadores y grupos de biomarcadores que pueden usarse para el diagnóstico no invasivo de trastornos relacionados con el embarazo, junto con ensayos de diagnóstico que usan tales biomarcadores.
- GRAVETT MICHAEL G *et al.*, JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 6, n.º 1, 1 de enero de 2007, páginas 89-96 desvela que la infección intraamniótica (IAI) está asociada con el nacimiento prematuro y la mortalidad perinatal. Los autores realizan un estudio exhaustivo de proteoma de flujo vaginal cervical (FVC) a partir de un modelo de IAI de primate utilizando tecnología de identificación de proteínas multidimensional (LC/LC-MS/MS) y análisis MALDI-TOF-MS. Los autores informan que estos análisis de proteoma de FVC identifican 205 proteínas únicas y la expresión diferencial de proteínas 27 en controles y muestras de IAI. Se describe el uso de distintivos de expresión de proteínas e inmunodetección de biomarcadores específicos para la detección no invasiva de IAI.
- HITTI *et al.*, AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, vol. 195, n.º 6, 1 de diciembre de 2006, página S5, describe un análisis del proteoma del flujo vaginal con el fin de identificar predictores no invasivos de infección intraamniótica (IAI) y nacimiento prematuro (PTB).
- HOLST ROSE-MARIE *et al.*, ACTA OBSTETRICIA ET GYNECOLOGICA SCANDINAVICA, vol. 84, n.º 6, junio de 2005, páginas 551-557 desvela que IL-6 $\geq 1,7$ ng/ml cervical estaba relacionada con la inflamación intraamniótica y tenía una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y un valor predictivo negativo del 58, 83, 75 y 69 %, respectivamente, en la identificación de inflamación intraamniótica. Se informó de datos similares para L-8 $\geq 6,7$ ng/ml.
- JACOBSSON BO *et al.*, AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, vol. 189, n.º 4, octubre de 2003 (10-2003), páginas 1161-1167, desvela que la proteína-1 quimiotáctica de monocitos en fluido amniótico y cervical era superior en mujeres con parto prematuro que en mujeres a término. La proteína-1 quimiotáctica de monocitos en mujeres con parto prematuro se asoció con la invasión microbiana de la cavidad amniótica, inflamación

intraamniótica, parto a los 7 días y a las ≤34 semanas. La proteína-1 quimiotáctica de monocitos estaba correlacionada con la invasión microbiana de la cavidad amniótica en mujeres con ruptura prematura de membranas pretérmino, inflamación intraamniótica en parto prematuro, ruptura prematura de membranas pretérmino, parto a los 7 días y parto a las ≤34 semanas en mujeres con parto prematuro.

5 El documento WO 2008/057160 desvela ensayos múltiplex, que incluyen paneles de sondas para el desarrollo de ensayos múltiplex capaces de medir simultáneamente múltiples proteínas biológicamente relevantes usando muy pequeñas cantidades de muestras biológicas para evaluar rápidamente el estado de salud de animales, especialmente animales de compañía, así como para formular regímenes nutricionales para mejorar el estado de salud de animales.

10 El documento US 2007/0178605 A1 desvela métodos y composiciones relacionadas con perfiles de biomarcadores para cada trimestre de embarazo. También se describen métodos para identificar pacientes con riesgo de desarrollar una complicación en el embarazo, tal como preeclampsia.

15 15 El documento US6.008.056 desvela un método para evaluar un volumen preseleccionado de muestra sobre una tira cromatográfica que incluye proporcionar un depósito receptor de muestras.

Sumario

20 La presente invención se refiere a ensayos para el diagnóstico y/o evaluación del riesgo de infección intraamniótica (IAI) en mujeres embarazadas, según se define mediante las reivindicaciones. La divulgación se refiere adicionalmente a la identificación y detección de biomarcadores y grupos o combinaciones de biomarcadores que pueden usarse para el diagnóstico no invasivo de infección intraamniótica (IAI) y ensayos de diagnósticos usando tales biomarcadores, que incluye un ensayo no invasivo basado en el uso de una única combinación de tres biomarcadores de proteínas para diagnosticar y/o evaluar el riesgo de infección intraamniótica (IAI) en mujeres embarazadas. La presente divulgación se refiere generalmente a materiales y procesos usados para crear el ensayo desarrollado en laboratorio de infección intraamniótica y el dispositivo de diagnóstico *in vitro* y a biomarcadores que tienen utilidad clínica en el diagnóstico de IAI. En particular, la divulgación se refiere a materiales y procesos usados para crear un dispositivo de diagnóstico *in vitro* para diagnosticar o evaluar el riesgo de IAI analizando una muestra biológica, tal como flujo vaginal cervical (FVC) obtenido a partir de una mujer embarazada. En particular, la presente divulgación se refiere a biomarcadores que, especialmente cuando se usan en combinación con un algoritmo de diagnóstico, tienen la capacidad de predecir la presencia de IAI usando un ensayo de inmunodiagnóstico, a base de hisopado cervical vaginal no invasivo con un alto grado de precisión. Esta combinación única de marcadores, cuando se usan en combinación con un algoritmo de diagnóstico, tienen la capacidad de predecir la presencia de IAI usando un ensayo de inmunodiagnóstico, a base de hisopado cervical vaginal no invasivo con un alto grado de precisión.

40 En una realización, la divulgación proporciona paneles nuevos de biomarcadores que pueden medirse y usarse para determinar la presencia o ausencia de IAI en un sujeto mamífero de sexo femenino en estado de embarazo.

45 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico de infección intraamniótica en un sujeto mamífero de sexo femenino en estado de embarazo que comprende (a) medir en una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto en nivel de alfa fetoproteína (AFP) e interleucina6 (IL-6) con respecto al nivel en flujo vaginal-cervical normal o flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica; y (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si se determina que dicho nivel muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel en dicho flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel de dicho flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica. En una realización, el sujeto es un paciente humano. 50 En determinadas realizaciones, el método de la divulgación incluye medir la abundancia de al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o de todas las proteínas.

55 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para el diagnóstico de infección intraamniótica en un sujeto mamífero de sexo femenino en estado de embarazo que comprende (a) medir en una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto los niveles de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO-a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina6 (IL-6), proteína de unión de lipopolisacáridos (LBP), molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1), en relación con los niveles correspondientes de dichas dos o más proteínas en flujo vaginal-cervical normal o flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica; y (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si se determina que cada uno de dichos niveles de cada una de dichas dos o más proteínas en dicha muestra demuestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de cada una de dichas proteínas en flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de cada una de dichas dos o más proteínas en dicho flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica. En una realización, el sujeto es un paciente 60 65

humano. En determinadas realizaciones, el método de la divulgación incluye medir los niveles de al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o de todas las proteínas.

- 5 En una realización, los biomarcadores medidos incluyen oncocérnulo regulado por crecimiento alfa (GRO-a) y proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b). En otra realización, los biomarcadores medidos incluyen oncocérnulo regulado por crecimiento alfa (GRO-a) y alfa-1-glicoproteína acida (A1AG). En otra realización más, los biomarcadores medidos incluyen alfa-1-glicoproteína acida (A1AG) y proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b). En estas realizaciones, biomarcadores adicionales medidos pueden incluir alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula de adhesión a células vasculares -1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) y/o inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1). En realizaciones adicionales, los biomarcadores medidos pueden incluir proteína de unión de IGF-1 (IGFBP-1).
- 10 15 En determinadas realizaciones, los biomarcadores medidos incluyen inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1) y oncocérnulo regulado por crecimiento alfa (GRO-a). En determinadas realizaciones, los biomarcadores medidos incluyen inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP1) y proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b). En determinadas realizaciones, los biomarcadores medidos incluyen inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1) y alfa-1-glicoproteína acida (A1AG). En estas realizaciones, biomarcadores adicionales medidos pueden incluir interleucina-6 (IL-6).
- 20 25 En determinadas realizaciones, los biomarcadores medidos pueden incluir alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6) y proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b). En determinadas realizaciones, los biomarcadores medidos incluyen interleucina-6 (IL-6), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), proteínas de unión de lipolisacáridos (LBP), oncocérnulo regulado por crecimiento alfa (GRO-a) y alfa fetoproteína (AFP).

30 35 En una realización, los métodos de la divulgación incluyen medir el nivel de proteínas de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1), así como diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica, si dos o más dichas proteínas sometidas a ensayo muestran una diferencia estadísticamente significativa en la muestra de flujo vaginal-cervical en relación con un flujo vaginal-cervical normal.

40 45 En una realización, los métodos de la divulgación incluyen medir los niveles de cada dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1), así como diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica, si el nivel de cada una de las dos o más dichas proteínas sometidas a ensayo muestran una diferencia estadísticamente significativa en la muestra de flujo vaginal-cervical en relación con el nivel de proteínas correspondiente en un flujo vaginal-cervical normal.

50 55 En determinadas realizaciones, los métodos de la divulgación incluyen diagnosticar el sujeto con infección intraamniótica, si los niveles de todas dichas proteínas sometidas a ensayo muestran una diferencia estadísticamente significativa en la muestra de flujo vaginal-cervical en relación con los niveles correspondientes de dichas proteínas en un flujo vaginal-cervical normal. En todas las realizaciones, el nivel de proteínas identificadas en el presente documento puede determinarse mediante un inmunoensayo. En determinadas realizaciones, los niveles de proteínas identificadas en el presente documento pueden determinarse usando una matriz de proteínas. En determinadas realizaciones, los niveles de proteínas identificadas en el presente documento pueden determinarse usando un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico. En determinadas realizaciones que usan un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico, los niveles de proteínas identificadas en el presente documento pueden determinarse usando un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico que comprende una o más tiras de ensayo cromatográfico.

60 En determinadas realizaciones que usan un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico, el dispositivo de ensayo inmunocromatográfico es un dispositivo de flujo lateral.

65 75 En determinadas realizaciones, la invención proporciona un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico que comprende tiras de cromatografía para la detección de alfa fetoproteína (AFP) e interleucina-6 (IL-6). En realizaciones, el dispositivo de ensayo inmunocromatográfico comprende tiras de ensayo que comprenden anticuerpos a dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncocérnulo regulado por crecimiento alfa (GRO-a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula de adhesión a células vasculares -1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1). En realizaciones, el dispositivo de ensayo inmunocromatográfico es un dispositivo de flujo lateral.

80 85 En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico que comprende tres o más tiras de cromatografía para la detección de tres o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncocérnulo regulado por crecimiento alfa (GRO-a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión IGF-1

(IGFBP-1), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula de adhesión a células vasculares -1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1). En realizaciones, el dispositivo de ensayo inmunocromatográfico comprende tiras de ensayo que comprenden anticuerpos a tres o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén

5 regulado por crecimiento alfa (GRO-a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión IGF-1 (IGFBP-1), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula de adhesión a células vasculares -1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1). En realizaciones, el dispositivo de ensayo inmunocromatográfico es un dispositivo de flujo lateral.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para el diagnóstico de infección intraamniótica en un sujeto mamífero de sexo femenino en estado de embarazo que comprende:

15 (a) obtener una muestra de flujo vaginal-cervical de dicho sujeto; (b) determinar el nivel de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO-a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1), en relación con los niveles correspondientes de dichas dos o más proteínas en flujo vaginal-cervical normal o flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica; y 20 diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si se determina que dichos niveles de cada una de dichas dos o más proteínas muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de cada una de dichas dos o más proteínas en flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de cada una de dichas dos o más proteínas en flujo vaginal-cervical conocido por ser 25 indicativo de infección intraamniótica.

30 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para determinar signos y síntomas que indican infección intraamniótica que comprenden

35 (a) medir en una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto el nivel de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO-a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1), en relación con el nivel en flujo vaginal-cervical normal o flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica; y

40 (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si se determina que dicho nivel muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel en dicho flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel de dicho flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica. En determinadas realizaciones, los signos y síntomas incluyen, pero sin limitación, fiebre materna ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$), leucocitosis materna ($\geq 15.000 / \text{mm}^3$), taquicardia materna y/o fetal, sensibilidad uterina y/o fluido amniótico fétido.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para determinar signos y síntomas que indican infección intraamniótica que comprenden

50 (a) medir en una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto los niveles de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO-a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1), en relación con los niveles correspondientes de dichas dos o más proteínas en flujo vaginal-cervical normal o en relación con los niveles correspondientes de dichas dos o más proteínas en flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica; y

55 (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si se determina que cada uno de dichos niveles de dichas dos o más proteínas en dicha muestra demuestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de cada una de dichas dos o más proteínas en dicho flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de cada una de dichas dos o más proteínas en dicho flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica. En determinadas realizaciones, los signos y síntomas incluyen, pero sin limitación, fiebre materna ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$), leucocitosis materna ($\geq 15.000 / \text{mm}^3$), taquicardia materna y/o fetal, sensibilidad uterina y/o fluido amniótico fétido.

En un aspecto, la divulgación se refiere un método para el diagnóstico de infección intraamniótica en un sujeto mamífero de sexo femenino en estado de embarazo que comprende:

- 5 (a) someter a ensayo una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto los niveles de α -fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6) y proteína de unión de IGF-1 (IGFBP-1); y
- 10 (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si cada uno de dichos niveles de AFP, IL-6 y IGFBP-1 en dicha muestra se determina que muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de AFP, IL-6 y IGFBP-1 en flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de cada una de AFP, IL-6 y IGFBP-1 en flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica.
- En una realización, el paciente es un paciente humano.
- 15 En otra realización se implementa un ensayo usando un aparato adaptado para determinar el nivel de proteínas. En aún otra realización se realiza el ensayo usando un programa de software ejecutado por un procesador adecuado.
- 20 En una realización adicional, el programa está materializado en software almacenado sobre un medio tangible. En todavía una realización adicional, el medio tangible se selecciona del grupo que consiste en una memoria flash, un CD-ROM, un disquete, un disco duro, un DVD y una memoria asociada con el procesador.
- 25 En una realización distinta, el método comprende además la etapa de preparar un informe que registra los resultados de dicho ensayo o el diagnóstico, donde el informe puede registrarse o almacenarse sobre un medio tangible, tal como papel, memoria flash, un CD-ROM, un disquete, un disco duro, un DVD o una memoria asociada con el procesador.
- 30 En otra realización, el método comprende además la etapa de comunicar los resultados de dichos diagnósticos a una parte interesada, tal como el paciente o el médico interviniente. En diversas realizaciones, la comunicación es por escrito, por e-mail o por teléfono.
- 35 En otra realización más, los niveles de proteínas se determinan mediante un inmunoensayo. En una realización adicional, los niveles de proteínas se determinan mediante un ensayo inmunocromatográfico, que puede emplear un dispositivo de flujo lateral.
- 40 En otras realizaciones adicionales, los niveles de proteínas se determinan mediante espectrometría de masas o mediante el uso de una matriz de proteínas.
- En otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit de inmunoensayo que comprende anticuerpos y reactivos para la detección de α -fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6) y proteína de unión de IGF-1 (IGFBP-1).
- 45 En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico que comprende una o más tiras de cromatografía para la detección de α -fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6) y proteína de unión de IGF-1 (IGFBP-1).
- 50 En una realización, en el dispositivo de ensayo inmunocromatográfico la tira de ensayo o tiras de ensayo comprende(n) anticuerpos de α -fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6) y proteína de unión de IGF-1 (IGFBP-1).
- En otra realización, el dispositivo de ensayo inmunocromatográfico es un dispositivo de flujo lateral.
- 55 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un informe que comprende los resultados de y/o diagnóstico basado en un ensayo que comprende
- (a) someter a ensayo una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto los niveles de α -fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6) y proteína de unión de IGF-1 (IGFBP-1); y
- 60 (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si se determina que dicho nivel muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel en flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel de flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica.
- 65 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un informe que comprende los resultados de y/o diagnóstico basado en un ensayo que comprende

- (a) someter a ensayo una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto los niveles de α -fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6) y proteína de unión de IGF-1 (IGFBP-1); y
- 5 (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si cada uno de dichos niveles de AFP, IL-6 y IGFBP-1 se determina que muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel correspondiente de AFP, IL-6 y IGFBP-1 en flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel correspondiente de AFP, IL-6 y IGFBP-1 en flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica.
- 10 Aún en un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un medio tangible que almacena los resultados de y/o diagnóstico basado en un ensayo que comprende
- (a) someter a ensayo una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto el nivel de α -fetoproteína, interleucina-6 (IL-6) y proteína de unión de IGF-1 (IGFBP-1); y
- 15 (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si se determina que dicho nivel muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel en flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel de flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica.
- 20 En determinadas realizaciones, la medición se implementa un ensayo usando un aparato adaptado para determinar el nivel de dichas proteínas. En otra realización, la medición se realiza el ensayo usando un programa de software ejecutado por un procesador adecuado. En determinadas realizaciones, el programa está materializado en software almacenado sobre un medio tangible. En determinadas otras realizaciones, el medio tangible se selecciona del grupo que consiste en una CD- ROM, un disquete, un disco duro, un DVD y una memoria asociada con el procesador.
- 25 En determinadas realizaciones, los métodos de la divulgación incluyen adicionalmente una etapa de preparación de un informe que registra los resultados del ensayo o el diagnóstico. En una realización, el informe se registra o almacena sobre un medio tangible. En una realización específica, el medio tangible es papel. En otra realización, el medio tangible se selecciona del grupo que consiste en una CD- ROM, un disquete, un disco duro, un DVD y una memoria asociada con el procesador.
- 30 En determinadas realizaciones, los métodos de la divulgación incluyen además una etapa de comunicar los resultados de dichos diagnósticos a una parte interesada. En una realización, la parte interesada es el paciente o el médico interviniente. En otra realización, la comunicación es por escrito, por e-mail o por teléfono.
- 35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit de inmunoensayo que comprende anticuerpos y reactivos para la detección de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO- α), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula de adhesión a células vasculares -1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1). En una realización, el kit de inmunoensayo incluye anticuerpos y reactivos para la detección de todas las proteínas identificadas en el presente documento.
- 40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit de inmunoensayo que comprende anticuerpos y reactivos para la detección de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO- α), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión IGF-1 (IGFBP-1), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula de adhesión a células vasculares -1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1). En una realización, el kit de inmunoensayo incluye anticuerpos y reactivos para la detección de todas las proteínas identificadas en el presente documento.
- 45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit de inmunoensayo que comprende anticuerpos y reactivos para la detección de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1).
- 50 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un kit de inmunoensayo que comprende anticuerpos y reactivos para la detección de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1).
- 55 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un informe que comprende los resultados y/o diagnóstico basado en un ensayo que comprende (a) medir en una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto el nivel de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO- α), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1), en relación con el nivel en flujo vaginal-cervical normal o flujo

vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica; y (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si se determina que dicho nivel muestra una diferencia estadísticamente significativas en relación con el nivel en dicho flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel de dicho flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un medio tangible que almacena los resultados y/o diagnóstico basado en un ensayo que comprende (a) medir en una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto el nivel de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO- α), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1), en relación con el nivel en flujo vaginal-cervical normal o flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica; y (b) diagnosticar dicho sujeto con infección intraamniótica si se determina que dicho nivel muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel en dicho flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con el nivel de dicho flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de infección intraamniótica.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de GROalfa (Ensayo 1) en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

25 La Figura 2 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de MIP 1b en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

La Figura 3 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de MCP-1 en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

30 La Figura 4 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de B2MG en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

35 La Figura 5 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de TIMP-1 en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

La Figura 6 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de A1AG en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

40 La Figura 7 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de IL-6 en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

La Figura 8 muestra el valor de logaritmo natural de LBP en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

45 La Figura 9 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de AFP en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

50 La Figura 10 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de VCAM-1 en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

La Figura 11 ilustra el AUROC de un modelo de tres marcadores para la predicción de IAI frente a no IAI. La sensibilidad es del 86 %, la especificidad del 85 %.

55 La Figura 12 ilustra el AUROC de un modelo de cinco marcadores para la predicción de IAI frente a no IAI. La sensibilidad es del x % y la especificidad del y %.

La figura 13 ilustra los niveles de puntuación del biomarcador Z del estado de IAI compuesto de 0 o 1.

60 La Figura 14 ilustra los datos que se muestran en la Figura 13 con gráficos de Sensibilidad frente a 1-Especificidad, con un AUROC de 0,86. La sensibilidad fue del 82 %, la especificidad del 85 %, el PPV del 33 % y el NPV del 98 %.

65 La Figura 15 ilustra un gráfico de Kaplan-Meier que muestra el tiempo de parto por el estado de FVC y el estado de infección de FA.

La figura 16 ilustra los niveles de puntuación del biomarcador Z del estado de IAI compuesto de 0 o 1.

La Figura 17 ilustra los datos que se muestran en la Figura 16 con gráficos de Sensibilidad frente a 1-Especificidad, con un AUROC de 0,88. La sensibilidad fue del 82 %, la especificidad del 89 %, el PPV del 41 % y el NPV del 98 %.

5 **Descripción detallada**

10 **Definiciones**

Debe comprenderse que esta divulgación no se limita a realizaciones particulares, que pueden, por supuesto, variar. También se comprende que la terminología usada en la presente memoria es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante. Tal y como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, los términos en singulares y las formas singulares "un", "uno", "una" y "el", "la", por ejemplo, incluyen opcionalmente referencias en plural a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una sonda" opcionalmente incluye una pluralidad de moléculas de sonda; de manera similar, dependiendo del contexto, el uso del término "un ácido nucleico" opcionalmente incluye, de manera práctica, muchas copias de esa molécula de ácido nucleico. Las designaciones de letras de genes o proteínas pueden referirse a la forma del gen y/o la forma de la proteína, dependiendo del contexto. Un experto es completamente capaz de relacionar el ácido nucleico y las formas de aminoácidos de las moléculas biológicas relevantes mediante referencia a las secuencias del presente documento, secuencias conocidas y el código genético.

25 Salvo que definan de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente divulgación. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2^a ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994) proporciona a un experto en la técnica con una guía general de muchos de los términos usados en la presente solicitud.

30 Los términos "que corresponde" y "corresponder" y equivalentes gramaticales se usan en el presente documento para sustancias análogas o similares; por ejemplo, cuando se hace referencia a dos mezclas de proteínas, proteína A en la primera mezcla corresponde a, y es la proteína correspondiente de, la proteína A en la segunda mezcla; la proteína B en la primera mezcla corresponde a, y es la proteína correspondiente de, la proteína B en la segunda mezcla; y así sucesivamente.

35 El término "proteoma" tal como se usa en el presente documento describe una parte significativa de proteínas en una muestra biológica en un momento dado. El concepto de proteoma es fundamentalmente distinto del de genoma. Mientras que el genoma es prácticamente estático, el proteoma cambia continuamente en respuesta a factores internos y externos.

40 El término "perfil proteómico" se usa para referirse a la representación del patrón de expresión de una pluralidad de proteínas en una muestra biológica, por ejemplo, un fluido biológico en un momento dado. El perfil proteómico puede, por ejemplo, representarse como un espectro de masas, pero también se incluyen otras representaciones basadas en cualquier propiedad fisicoquímica o bioquímica de las proteínas. Por lo tanto, el perfil proteómico puede, por ejemplo, basarse en diferencias en las propiedades electroforéticas de las proteínas, tal como se determina mediante electroforesis en gel bidimensional, por ejemplo, mediante 2-D PAGE, y puede representarse, por ejemplo, como una pluralidad de manchas en un gel de electroforesis bidimensional. Los perfiles de expresión diferencial pueden tener un valor de diagnóstico importante, incluso en la ausencia de proteínas específicamente identificadas. Las manchas de proteínas únicas pueden detectarse, a continuación, por ejemplo, mediante inmunotransferencia, múltiples manchas o proteínas que usan micromatrices. El perfil proteómico representa normalmente o contiene información que podría variar de unos pocos picos a un perfil complejo que representara 50 o más picos. Por lo tanto, por ejemplo, el perfil proteómico puede contener o representar el menos 2, o al menos 5 o al menos 10 o al menos 15, o al menos 20, o al menos 25, o al menos 30, o al menos 35, o al menos 40, o al menos 45, o al menos 50, o al menos 60, o al menos 65, o al menos 70, o al menos 75, o al menos 80, o al menos 85, o al menos 85, o al menos 90, o al menos 95, o al menos 100, o al menos 125, o al menos 150, o al menos 175, o al menos 200 proteínas.

60 El término "afección patológica" se usa en su sentido más amplio y cubre todos los cambios y fenómenos que comprometen el bienestar de un sujeto. Afecciones maternas patológicas incluyen, sin limitación, infección intraamniótica, afecciones de origen materno o fetal, tales como, por ejemplo, preeclampsia y parto y alumbramiento prematuro. Afecciones fetales patológicas incluyen, sin limitación, defectos cromosómicos (aneuploidías), tales como síndrome de Down y todas las anomalías en edad gestacional y madurez fetal.

65 El término "estado de una afección [materna o fetal] patológica" se usa en el presente documento en su sentido más amplio y se refiere a la ausencia, presencia, magnitud, fase, naturaleza, progresión o regresión de la afección patológica.

El término "distintivo de expresión única" se usa para describir un rasgo único o motivo dentro del perfil proteómico de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de referencia) que difiere del perfil proteómico de una muestra biológica normal correspondiente (obtenida a partir del mismo tipo de fuente, por ejemplo, fluido biológico) de un modo estadísticamente significativo.

- 5 Los términos "infección intraamniótica (IAI)", "infección de fluido amniótico", "amnionitis", y "corioamnionitis clínica" se usan indistintamente y se refieren a una infección aguda, que incluye, pero no restringida a contenidos bacterianos, del fluido amniótico e intrauterinos durante el embarazo.
- 10 La "respuesta del paciente" puede evaluarse usando cualquier criterio de valoración que indique un beneficio para el paciente, que incluye, sin limitación, (1) inhibición, al menos hasta cierto punto, de la progresión de la afección patológica, (2) prevención de la afección patológica, (3) alivio, al menos hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados con la afección patológica; (4) aumento en la duración de supervivencia después del tratamiento; y/o (5) disminución de mortalidad en un momento dado después del tratamiento.
- 15 15 El término "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, cuyo objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico diana. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se quiera prevenir el trastorno.
- 20 20 La "malformación congénita" es una anomalía que no es hereditaria pero que existe en el nacimiento.
- 25 La designación de cualquier proteína particular, tal como se usan en el presente documento, incluye todos los fragmentos, precursores y variantes de origen natural, tales como variantes e isoformas alélicas y alternativamente empalmadas, así como formas solubles de la proteína nombrada, junto con homólogos de secuencia nativa (que incluye todas las variantes de origen natural) en otras especies. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se indica que la abundancia de proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (Swiss-Prot Acc. No. P13236) se somete a ensayo, la afirmación incluye específicamente el ensayo de cualquier fragmento, precursor o variante de origen natural de la proteína enumerada según Swiss-Prot Acc. No. 13236, así como sus homólogos no humanos y variantes de origen natural del mismo, si es sujeto no es humano.
- 30

Descripción detallada

- 35 La presente divulgación se refiere a métodos y medios para un ensayo temprano, fiable y no invasivo de afecciones maternas y fetales según el perfil proteómico de un fluido biológico de la madre o el feto. En particular, la presente divulgación está basada en el descubrimiento de marcadores de proteínas que están diferencialmente presentes en muestras de pacientes con IAI y sujetos de control, y la aplicación de este descubrimiento en métodos y kits para determinar la presencia o ausencia de IAI. Estos marcadores de proteínas se encuentran en muestras de pacientes con IAI en niveles que son distintos a los niveles en muestras de pacientes sin IAI. Por consiguiente, la cantidad de dos o más marcadores encontrados en una muestra de ensayo en comparación con una de control, o la presencia o ausencia de dos o más marcadores en la muestra de ensayo proporciona información útil con respecto al estado de la IAI del paciente.
- 40 45 La presente divulgación también se refiere a métodos y medios para un ensayo temprano, fiable y no invasivo de afecciones maternas y fetales según el perfil proteómico de un fluido biológico de la madre o el feto. En particular, la presente divulgación proporciona ensayos diagnósticos y pronósticos para la detección temprana y fiable de IAI midiendo alfa fetoproteína (α -fetoproteína), interleucina-6 (IL-6) y proteína de unión al factor de crecimiento de insulina-1 (IGFBP-1) en un fluido biológico, tal como flujo vaginal cervical (FVC), obtenido a partir de una mujer embarazada o feto.
- 50 55 La divulgación se basa a demás en el descubrimiento de que la incorporación de los signos y síntomas del sujeto, por ejemplo, fiebre materna ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$), leucocitosis materna ($\geq 15.000 / \text{mm}^3$), taquicardia materna o fetal, sensibilidad uterina o fluido amniótico fétido, en el algoritmo de diagnóstico resulta útil en la determinación de si la IAI está presente o ausente.
- 60 65 La divulgación utiliza técnicas proteómicas bien conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en los siguientes libros de texto: Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics (Principles and Practice), M. R. Wilkins et al., eds., Springer Verlag, 1007; 2-D Proteome Analysis Protocols, Andrew L Link, editor, Humana Press, 1999; Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods (Principles and Practice), T. Rabillo editor, Springer Verlag, 2000; Proteome Research: Mass Spectrometry (Principles and Practice), P. James editor, Springer Verlag, 2001; Introduction to Proteomics, D. C. Liebler editor, Humana Press, 2002; Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis, R. Westermeier et al., eds., John Wiley & Sons, 2002.
- 65 El experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrán utilizarse en la práctica de la presente divulgación. De hecho, la presente

divulgación no está limitada en modo alguno por los métodos y materiales descritos.

1. Identificación de proteínas y polipéptidos expresados en fluidos biológicos

- 5 De acuerdo con la presente divulgación, el análisis proteómico de fluidos biológicos puede llevarse a cabo usando diversos métodos conocidos en la técnica. Estos fluidos biológicos incluyen, por ejemplo, flujo vaginal-cervical (FVC), sangre del cordón umbilical, suero neonatal, líquido cefalorraquídeo (LCR), fluido amniótico, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, leche materna, moco, saliva y sudor.
- 10 Normalmente, los patrones proteínicos (mapas de proteomas) de muestras de distintas fuentes, tales como fluido biológico normal (muestra normal) y un fluido biológico de ensayo (muestra de ensayo), se comparan para detectar proteínas que están reguladas en positivo o en negativo en una enfermedad. Estas proteínas pueden escindirse para su identificación y caracterización completa, por ejemplo, usando inmunoensayos, identificación genética de masa de péptido y/o espectrometría de masas y métodos de secuenciación, o el mapa de proteomas específico de la enfermedad y/o normal puede usarse directamente para el diagnóstico de la enfermedad de interés, o para confirmar la presencia o ausencia de la enfermedad.

En análisis comparativos, es importante tratar las muestras normales y de ensayo exactamente del mismo modo, para representar correctamente el nivel relativo o abundancia de proteínas y obtener resultados precisos. La cantidad requerida de proteínas totales dependerá de la técnica analítica usada y puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Las proteínas presentes en las muestras biológicas se separan normalmente mediante electroforesis en gel bidimensional (2-DE) según su *pI* y peso molecular. Las proteínas se separan en primer lugar por su carga usando isoelectrofoque (electroforesis en gel unidimensional). Esta etapa puede, por ejemplo, llevarse a cabo usando tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG), que están disponibles en el mercado. La segunda dimensión es un análisis SDS-PAGE normal, en el que la tira de IPG enfocada se usa como muestra. Después de la separación de 2-DE, las proteínas pueden visualizarse con tintes convencionales, tal como azul de Coomassie o tinción de plata, y formadas por imágenes usando técnicas y equipamiento, tal como, por ejemplo, densitómetro Bio-Rad 10 GS800 y software PDQUEST, que ambos están disponibles en el mercado.

30 Manchas individuales se cortan a continuación a partir del gel, se destiñen y se someten a digestión tríptica. Las mezclas peptídicas pueden analizarse mediante espectrometría de masas (MS). Como alternativa, los péptidos pueden separarse, por ejemplo, mediante cromatografía de alta presión en fase líquida (HPLC) de capilares y puede analizarse mediante MS bien individualmente o en agrupaciones.

35 Los espectrómetros de masas consisten en una fuente de iones, analizador de masas, detector de iones y unidad de adquisición de datos. En primer lugar, los péptidos se ionizan en la fuente de iones. A continuación, los péptidos ionizados se separan según su relación masa a carga en el analizador de masas y los iones separados se detectan. Las espectrometría de masas se ha usado en gran medida en análisis de proteínas, especialmente desde la invención de la desorción/ionización láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDITOF) y métodos de ionización de electropulverización (ESI). Existen varias versiones de analizador de masas, que incluye, por ejemplo, MALDI-TOF y triple o cuádruple-TOF o analizador de masas de trampa de iones acoplado a ESI. Por lo tanto, por ejemplo, un espectrómetro de Q-ToF-2 utiliza un analizador de tiempo en vuelo ortogonal que permite la detección simultánea de iones por todo el intervalo de espectro de masas completo. Para detalles adicionales, véase, Por ejemplo, Chemusevich *et al.*, *J. Mass Spectrom.* 36:849-865 (2001). Si se desea, las secuencias de aminoácidos de los fragmentos de péptido y finalmente las proteínas de las que derivan pueden determinarse mediante técnicas conocidas en la técnica, tal como determinadas variaciones de la espectrometría de masas o degradación de Edman.

2. Detección temprana de infección intraamniótica y complicaciones relacionadas

50 La infección intraamniótica (IAI) es una infección bacteriana aguda del fluido amniótico y contenido intrauterino durante el embarazo. Estudios prospectivos indican que la IAI aparece en el 4 % al 10 % de todos los partos (Newton, E. R., Prihoda, T. J., and Gibbs, R. S.: Logistic regression analysis of risk factors for intra-amniotic infection. *Obstet. Gynecol.* 73:571, 1989; Soper, D. E., Mayhall, C. G., and Dalton, H. P.: Risk factors for intraamniotic infection: a prospective epidemiologic study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161:562, 1989; y Lopez-Zeno, J. A., Peaceman, A. M., Adashek, J. A., and Socol, M. L.: A controlled trial of a program for the active management of labor. *N. Engl. J. Med.* 326:450, 1992). Otros términos usados para describir IAI incluyen infección de fluido amniótico, amnionitis y corioamnionitis clínica. La infección intraamniótica se diagnostica clínicamente por la fiebre materna, sensibilidad uterina, leucocitosis y taquicardia fetal y debe distinguirse de la corioamnionitis histológica. La infección intraamniótica es una causa importante de morbilidad materna y neonatal. Las infecciones intraamnióticas ascienden a un 10-40 % de los casos de morbilidad febril en el período de parto y se asocian con un 20-40 % de los casos de sepsis y neumonía neonatal temprana. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. *Clin. Obstet. Gynecol.* 36:795, 1993). La bacteriemia materna se produce en un 2-6 % de los pacientes con IAI y la morbilidad infecciosa postparto se ve aumentada. También existe un riesgo aumentado de parto disfuncional y parto por cesárea entre los pacientes con IAI. Duff *et al.* informó de un 75 % de incidencia de parto disfuncional y un 34 % de incidencia de parto por cesárea entre pacientes que desarrollaron infección intraamniótica mientras estaban de

- parto (Duff, P., Sanders, R., and Gibbs, R. S.: *The course of labor in term pregnancies with chorioamnionitis*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 147:391, 1983). La infección intraamniótica también está asociada con morbilidad y mortalidad neonatal aumentada, particularmente entre neonatos prematuros. En general, existe un aumento de tres a cuatro veces en la mortalidad perinatal entre neonatos con nacimiento de bajo peso nacidos de madres con IAI (Gibbs, R. S., Castillo, M. A., and Rodgers, P. J.: *Management of Acute Chorioamnionitis*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 136:709, 1980; Gilstrap, L. C., Coleman, Leveno, K. J., Cox, S. M., Burris, J. S., Mashburn, M., and Rosenfeld, C. R.: *Intrapartum treatment of acute chorioamnionitis: impact on neonatal sepsis*. Am. J. Obstet. Gynecol. 159:579, 1988). También hay aumentos en síndrome de dificultad respiratoria, hemorragia intraventricular y sepsis neonatal, Morales, W. J.: *The effect of chorioamnionitis on the developmental outcome of preterm infants at one year*. Obstetrics and Gynecology 70:183, 1987). Recientemente, La IAI ha estado implicada en leucomalacia periventricular neonatal y parálisis cerebral; los riesgos de daño de materia blanca cerebral y parálisis cerebral son nueve veces superiores en el marco de infección intraamniótica, Bejar, R., Wozniak, P., Allard, M., Benirschke, K., Vaucher, Y., Coen, R., Berry, C., Schrapp, P., Villegas, I., y Resnik, R.: *Antenatal origin of neurologic damage in newborn infants. I. Preterm infants*. Am. J. Obstet. Gynecol. 159:357, 1988; Grether, J. K. and Nelson, K. B.: *Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight*. JAMA 278:207, 1997). Finalmente, la IAI subclínica se ha encontrado en al menos un 10 % de mujeres con parto prematuro con membranas fetales intactas, sugiriendo que la IAI es una causa importante, y potencialmente prevenible, de prematuridad (Romero, R., Avila, C., Brekus, C. A., y Morotti, R.: *The role of systemic and intrauterine infection in preterm parturition*. Annals of the New York Academy of Sciences 622:355, 1991). Una revisión bibliográfica por Newton demostró incidencias de IAI clínica del 41 % en edades gestacionales inferiores a 27 semanas, del 15 % en edades gestacionales de 27-37 semanas y del 2 % en gestaciones de 38 semanas o superiores (Newton et al., supra). Bacterias indígenas al tracto genital inferior también se han recuperado del fluido amniótico del 10-20 % de todas las mujeres con parto prematuro con membranas fetales intactas sin signos clínicos de infección intraamniótica (Romero et al., supra), y en hasta un 67 % de mujeres con parto prematuro con embarazos finalizando a las 23-24 semanas (Watts, D. H., Krohn, M. A., Hillier, S. L., and Eschenbach, D. A.: *The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor*. Obstet Gynecol 79:351, 1992). La mayoría de estos pacientes paren rápidamente y la IAI clínicamente aparente se desarrolla en mucho de ellos. Estas observaciones respaldan la hipótesis las infecciones intrauterinas inicialmente subclínicas ascendentes preceden el parto prematuro y pueden ser una causa importante de partos prematuros extremos.
- El parto prematuro se define como un nacimiento anterior a la 37^a semana completada de gestación. La incidencia de nacimiento prematuro en los Estados Unidos es del 10-11 % de todos los nacimientos vivos y va en aumento a pesar del tratamiento agresivo del parto prematuro. En su conjunto, la prematuridad y sus consecuencias son las responsables del 80 % de las muertes perinatales no atribuibles a malformaciones congénitas y suponen aproximadamente 5 mil millones anualmente para el presupuesto nacional para la atención de salud. Factores de riesgo de nacimiento prematuro incluyen raza no blanca, edad joven, estado socioeconómico bajo, peso maternal por debajo de 55 kg, nuliparidad, sangrado en el primer trimestre, gestaciones múltiples (Meis P J, Michielutte R, Peters T J, et al. *Factors associated with preterm birth in Cardiff, Wales: II. Indicated and spontaneous preterm birth*. Am J Obstet Gynecol 173:597-602, 1995).
- Desafortunadamente la predicción de pacientes en riesgo de nacimiento prematuro espontánea ha sido generalmente desalentadora (Creasy R K, Iams J D. *Preterm labor and delivery*. In *Maternal-Fetal Medicine*, Creasy R K, Resnik R (eds.). W.B. Saunders Company, Filadelfia, Pa. 4^a edición, 1999. Páginas 498-531). Los intentos anteriores en definir la población con mayor riesgo de nacimiento prematuro y, por lo tanto, beneficiándose potencialmente de una intervención temprana ha incluido índices de puntuación de riesgo, detección bioquímica de fibronectina fetal cervical, medición ultrasónica de longitud cervical y seguimiento de actividad uterina en el hogar. Estos programas han sido costosos y también se han visto obstaculizados por la incapacidad de predecir con precisión qué pacientes se beneficiarían de una intervención o profilaxis temprana. Todos adolecen de un valor predictivo positivo pobre de aproximadamente el 30 %, con la mayoría de pacientes identificados como parto "de riesgo" en término. Las intervenciones, que incluyen tratamiento farmacológico para inhibir contracciones uterinas, son eficaces, pero dependen de un diagnóstico temprano y fiable de parto prematuro. Los marcadores tempranos y fiables para identificar pacientes en mayor riesgo de nacimiento prematuro son, por lo tanto, necesarios para reducir los tremendos costes y mortalidad y morbilidad neonatal asociada con el nacimiento prematuro.
- 3. Detección y diagnóstico temprano de infección intraamniótica usando biomarcadores en fluidos biológicos**
- A) La presente divulgación proporciona un método temprano y fiable, no invasivo para el diagnóstico de infección intraamniótica mediante análisis proteómico de fluidos biológicos, tal como, por ejemplo, flujo vaginal-cervical (FVC), fluido amniótico, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, leche materna, moco o saliva. En una realización, la divulgación proporciona un método temprano y fiable, no invasivo para el diagnóstico de infección intraamniótica mediante inmunoensayo o un panel de inmunoensayos. En una realización, la divulgación proporciona un método temprano y fiable, no invasivo para el diagnóstico de infección intraamniótica mediante análisis proteómico de CVF.
- A modo de ejemplo no limitante, la presente divulgación proporciona métodos para el diagnóstico de infección intraamniótica en un sujeto de sexo femenino embarazada que comprende someter a ensayo en una muestra de

5 flujo vaginal-cervical materno obtenido a partir de dicho sujeto el nivel o la cantidad de una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO-a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), alfa-1-glicoproteína acida (A1AG), alfa fetoproteína (AFP), interleucina-6 (IL-6), proteína de unión de lipolisacáridos (LBP), molécula de adhesión a células vasculares -1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), beta-2-microglobulina (B2MG) e inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1). El diagnóstico de infección intraamniótica puede basarse en la diferencia estadísticamente significativa en el nivel, cantidad o abundancia de dichas proteínas en especímenes de pacientes que están definidos como positivos para IAI frente a especímenes de control que no tienen IAI. En determinadas realizaciones, el diagnóstico de infección intraamniótica puede mejorarse mediante la incorporación al algoritmo de diagnóstico los signos y 10 síntomas del sujeto. Por ejemplo, incorporación de signos y síntomas que incluyen, pero sin limitación, fiebre materna ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$), leucocitosis materna ($\geq 15.000 / \text{mm}^3$), taquicardia materna y/o fetal, sensibilidad uterina y/o fluido amniótico fétido, se pueden incluir en el algoritmo de diagnóstico.

Tabla 1. Biomarcadores de IAI

Registro	ID	Proteína	SEQ ID NO
P09341	GRO-a	oncogén regulado por crecimiento alfa	1
P13236	MIP1b	proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta	2
P02763	A1AG	alfa-1-glicoproteína acida	3
P02771	AFP	alfa-fetoproteína	4
P05231	IL-6	interleucina-6	5
P18428	LBP	proteína de unión de lipolisacáridos	6
P19320	VCAM-1	molécula de adhesión a células vasculares-1	7
P13500	MCP-1	proteína quimiotáctica de monocitos-1	8
P61769	B2MG	beta-2-microglobulina	9
P01033	TIMP-1	inhibidor tisular de metaloproteinasas-1	10

15 Tal como se ha señalado anteriormente, en el contexto de la presente divulgación el término "perfil proteómico" se usa para referirse a la representación del patrón de expresión de una pluralidad de proteínas en una muestra biológica, por ejemplo, un fluido biológico en un momento dado. El perfil proteómico puede, por ejemplo, representarse como un panel de resultados de inmunoensayo, pero también se incluyen otras representaciones basadas en cualquier propiedad fisicoquímica o bioquímica de las proteínas. Aunque resulta posible identificar y secuenciar todas o algunas de las proteínas presentes en el proteoma de un fluido biológico, no es necesario para el uso diagnóstico de los perfiles proteómicos generados según la presente divulgación. El diagnóstico de una enfermedad particular puede basarse en las diferencias características (distintivos de expresión únicos) entre un perfil proteómico normal y un perfil proteómica del mismo fluido biológico obtenido en las mismas circunstancias, 20 cuando la enfermedad o afección patogénica a diagnosticar está presente. El distintivo de expresión única puede ser cualquier rasgo único o motivo dentro del perfil proteómico de un ensayo o una muestra biológica de referencia que difiere del perfil proteómico de una muestra biológica normal correspondiente obtenida a partir del mismo tipo de fuente, de un modo estadísticamente significativo. Cuando el perfil proteómico de la muestra de ensayo obtenida a partir de un sujeto mamífero se compara con el perfil proteómico de una muestra de referencia que comprende un 25 distintivo de expresión única característico de una afección materna o fetal patológica, el sujeto mamífero se diagnostica con tal afección patológica si comparte el distintivo de expresión única con la muestra de referencia.

30 Una afección materna/fetal patológica particular puede diagnosticarse comparando el perfil proteómica en un fluido biológico obtenido a partir del sujeto a diagnosticar con el perfil proteómico de una fluido biológico normal del mismo tipo, obtenido y tratado del mismo modo. Si el perfil proteómico de la muestra de ensayo es esencialmente la misma que el perfil proteómico de la muestra normal, es sujeto se considera que está libre de la afección materna/fetal patológica del sujeto. Si el perfil proteómico de la muestra de ensayo muestra un distintivo de expresión único en 35 relación con el perfil proteómico de la muestra normal, el sujeto es diagnosticado con la afección materna/fetal en cuestión.

40 Como alternativa o además, el perfil proteómico de la muestra de ensayo puede compararse con el perfil proteómico de una muestra de referencia, obtenida a partir de un fluido biológico de un sujeto diagnosticado independientemente con la afección materna/fetal en cuestión. En este caso, el sujeto es diagnosticado con la afección patológica si el perfil proteómico de la muestra de ensayo comparte al menos un rasgo, o una combinación 45 de rasgos que representan un distintivo de expresión único, con el perfil proteómico de la muestra de referencia.

En los métodos de la presente divulgación el perfil proteómico de una muestra de ensayo biológica juega un papel diagnóstico importante. Como se analiza anteriormente, si el perfil proteómico de la muestra de ensayo es esencialmente la misma que el perfil proteómico de la muestra biológica normal, el paciente es diagnosticado como

que está libre de la afección materna/fetal patológica a ser identificada. Este diagnóstico "negativo" resulta de gran significancia, puesto que elimina la necesidad de someter al paciente a tratamiento o intervención innecesarios, lo que podría tener posibles efectos secundarios o podrían, de otro modo, poner al paciente, feto o neonato en riesgo. Los datos se analizan para determinar si las diferencias son estadísticamente significativas.

- 5 Los resultados que se detallan en los Ejemplos a continuación presentan perfil proteómicos característicos de infección intraamniótica (IAI) que difieren del perfil proteómico normal de flujo vaginal-cervical (FVC) de un modo estadísticamente significativo. Además, los Ejemplos presentan marcadores de expresión y distintivos de expresión única característicos de la IAI.
- 10 10 Un fluido biológico particularmente ventajoso para realizar métodos de diagnóstico no invasivos de la presente divulgación es el flujo vaginal-cervical (FVC). El FVC es un fluido biológico complejo que consiste en agua, electrolitos, compuestos orgánicos de bajo peso molecular (glucosa, aminoácidos y lípidos), células (leucocitos, linfocitos y células epiteliales) y una multitud de proteínas y enzimas proteolíticas que están predominantemente sintetizadas por el endocérvido (Blandau et al., *The Biology of the Cervix*. University of Chicago Press: Chicago, 1973; p xi, 450p). El FVC también contiene secreciones de células vaginales, que incluye mucinas, defensinas, factores de complemento, inmunoglobulinas, lactoferrina y colectinas (Blandau et al., supra). El FVC fluye por todo el tracto reproductivo femenino y lo lubrica, incluyendo la vagina, áreas cervicales y uterinas. El FVC forma la primera línea de defensa frente a patógenos externos, señales de fertilidad y ayuda en la inseminación, embarazo y parto (Blandau et al., supra; Bigelow, J. L. et al., *Hum Reprod* 2004, 19, (4), 889-92). El FVC contiene flora tal como *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus vaginalis*. Las secreciones de esta flora aportan un bajo pH al FVC, que mejora su actividad antipatógena (Blandau et al., supra). Cualquier desequilibrio en la flora vaginal o invasión de flora externa resulta en vaginosis bacteriana. En respuesta a la vaginosis bacteriana, la secreción de varias citocinas tales como IL-1a, IL-1f3, IL-10, IL-8 y TNF-ct en el FVC por el endopeptílico vaginal y cervical cambia (Mattsby-Baltzer, I et al., *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998, 77, (7), 701-6; Eschenbach, D. A. et al., *J Clin Microbiol* 1989, 27, (2), 251-6). La imposibilidad de frenar la vaginosis bacteriana se ha correlacionado positivamente con cáncer cervical (Mikamo, H et al., *J Infect Chemother* 1999, 5, (2), 82-85), enfermedad inflamatoria pélvica (Ness, R. B. et al., *Am J Epidemiol* 2005, 162, (6), 585-90.), endometritis (Haggerty, C. L. et al., *Clin Infect Dis* 2004, 39, (7), 990-5; Morris, M. et al., *Bjog* 2001, 108, (5), 439-50) e infertilidad tubárica (Morris et al., supra). La vaginosis bacteriana en mujeres embarazadas se ha correlacionado con un riesgo aumentado de parto prematuro y nacimiento prematuro (Graved, M. G. et al., *Jama* 1986, 256, (14), 1899-903).

- 35 35 Las citocinas y otras moléculas de defensa presentes en el FVC juegan un papel importante en la infección, replicación y proliferación de virus de inmunodeficiencia transmitidos sexualmente tales como VIH y virus del herpes simple (VHS) en la vagina (Poli, G. et al., *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992, 8, (2), 191-7; Zara, F. et al., *Sex Transm Infect* 2004, 80, (2), 108-12; John, M. et al., *J Infect Dis* 2005, 192, (10), 1731-40). El análisis de la fracción polipeptídica catiónica del FVC ha identificado 20 polipéptidos que contribuyen en la actividad anti-VIH (Venkataraman, N. et al., *J Immunol* 2005, 175, (11), 7560-7). Estudios previos también han identificado un papel del FVC en la captura de viriones del VIH, previniendo, de este modo, la infección (Maher, D. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102, (32), 11504-9; Quinones-Mateu, M. E et al., *Aids* 2003, 17, (16), F39-48). Estudios recientes han detectado una correlación entre varias moléculas de respuesta inmune y FVC y la incidencia de ruptura prematura de las membranas (PROM) subclínica, que lleva a el nacimiento prematuro (Helming, B. R. et al., *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002, 12, (4), 237-46; Ogino, M. et al., *J Obstet Gynaecol Res* 2005, 31, (5), 421-6). Durante el embarazo, el FVC podría contener fluido amniótico (FA) derivado del útero, bien debido a la interrupción o secreciones paralelas de la interfaz coriónica-decidua. Esta "fuga" de FA en el FVC proporciona la base para el diagnóstico no invasivo actual para la presencia de fibronectina fetal, que se ha usado para predecir el nacimiento prematuro en mujeres (Swamy, G. K. et al., *J Reprod Med* 2005, 50, (11), 851-6).

- 40 50 El FVC es un sitio de diagnóstico potencial importante para controlar la salud materna y fetal en mujeres embarazadas debido a su método de recogida mínimamente invasivo en comparación con FA, es decir, amniocentesis. Los biomarcadores y grupos o combinaciones de biomarcadores identificados en el presente documento proporcionan una herramienta de diagnóstico valiosa en la detección fiable de infección intraamniótica en un sujeto embarazado.

- 55 55 Los métodos estadísticos para comparar perfiles proteómicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los niveles de expresión de proteínas para una serie de biomarcadores pueden cuantificarse mediante inmunoensayo. La presencia o ausencia de un distintivo de expresión característico o la identidad sustancial de dos perfiles puede determinarse cotejando el perfil proteómico (patrón) de una muestra de ensayo con el perfil proteómico (patrón) de una muestra de referencia o normal, con un algoritmo apropiado. Se desvela un método estadístico para analizar patrones proteómicos, por ejemplo, In Antibiotics III, et al., *The Lancet* 359:572-77 (2002); Issaq et al., *Biochem Biophys Commun* 292:587-92 (2002); Ball et al., *Bioinformatics* 18:395-404 (2002); y Li et al., *Clinical Chemistry Journal*, 48:1296-1304 (2002).

- 60 65 (B) La presente divulgación proporciona un método temprano y fiable, no invasivo para el diagnóstico de infección intraamniótica mediante análisis proteómico de fluidos biológicos, tal como, por ejemplo, flujo vaginal-cervical (FVC), fluido amniótico, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, leche materna, moco o saliva. En

una realización, la divulgación proporciona un método temprano y fiable, no invasivo para el diagnóstico de infección intraamniótica mediante inmunoensayo. En una realización, la divulgación proporciona un método temprano y fiable, no invasivo para el diagnóstico de infección intraamniótica mediante análisis proteómico de CVF.

5 A modo de ejemplo no limitante, la presente divulgación proporciona métodos para el diagnóstico de infección intraamniótica en un sujeto de sexo femenino embarazada que comprende someter a ensayo en una muestra de flujo vaginal-cervical materno obtenido a partir de dicho sujeto la abundancia de al menos α -fetoproteína, IL-6 y 10 IGFBP1. El diagnóstico de infección intraamniótica basándose en la diferencia estadísticamente significativa en abundancia de estas proteínas en especímenes de pacientes que están definidos como positivos para IAI frente a 15 especímenes de control que no tienen IAI.

Tal como se ha señalado anteriormente, en el contexto de la presente divulgación el término "perfil proteómico" se 20 usa para referirse a la representación del patrón de expresión de una pluralidad de proteínas en una muestra biológica, por ejemplo, un fluido biológico en un momento dado. El perfil proteómico puede, por ejemplo, representarse como un espectro de masas, pero también se incluyen otras representaciones basadas en cualquier 25 propiedad fisicoquímica o bioquímica de las proteínas. Aunque resulta posible identificar y secuenciar todas o algunas de las proteínas presentes en el proteoma de un fluido biológico, no es necesario para el uso diagnóstico de los perfiles proteómicos generados según la presente divulgación. El diagnóstico de una enfermedad particular 30 puede basarse en las diferencias características (distintivos de expresión únicos) entre un perfil proteómico normal y un perfil proteómico del mismo fluido biológico obtenido en las mismas circunstancias, cuando la enfermedad o afección patogénica a diagnosticar está presente. El distintivo de expresión única puede ser cualquier rasgo único o motivo dentro del perfil proteómico de un ensayo o una muestra biológica de referencia que difiere del perfil 35 proteómico de una muestra biológica normal correspondiente obtenida a partir del mismo tipo de fuente, de un modo estadísticamente significativo. Por ejemplo, si el perfil proteómico se presenta en la forma de un espectro de masas, el distintivo de expresión única es normalmente un pico o una combinación de picos que difieren, cualitativa o cuantitativamente, del espectro de masas de una muestra normal correspondiente. Por lo tanto, la aparición de un 40 nuevo pico o una combinación de nuevos picos en el espectro de masas, o cualquier cambio estadísticamente significativo en la amplitud o forma de un pico existente o combinación de picos existente, o la desaparición de un pico existente, en el espectro de masas puede considerarse un distintivo de expresión única. Cuando el perfil 45 proteómico de la muestra de ensayo obtenida a partir de un sujeto mamífero se compara con el perfil proteómico de una muestra de referencia que comprende un distintivo de expresión única característico de una afección materna o fetal patológica, el sujeto mamífero se diagnostica con tal afección patológica si comparte el distintivo de expresión única con la muestra de referencia.

50 Una afección materna/fetal patológica particular puede diagnosticarse comparando el perfil proteómico en un fluido biológico obtenido a partir del sujeto a diagnosticar con el perfil proteómico de una fluido biológico normal del mismo tipo, obtenido y tratado del mismo modo. Si el perfil proteómico de la muestra de ensayo es esencialmente la misma que el perfil proteómico de la muestra normal, es sujeto se considera que está libre de la afección materna/fetal 55 patológica del sujeto. Si el perfil proteómico de la muestra de ensayo muestra un distintivo de expresión único en relación con el perfil proteómico de la muestra normal, el sujeto es diagnosticado con la afección materna/fetal en cuestión.

50 Como alternativa o además, el perfil proteómico de la muestra de ensayo puede compararse con el perfil proteómico 45 de una muestra de referencia, obtenida a partir de un fluido biológico de un sujeto diagnosticado independientemente con la afección materna/fetal en cuestión. En este caso, el sujeto es diagnosticado con la afección patológica si el perfil proteómico de la muestra de ensayo comparte al menos un rasgo, o una combinación de rasgos que representan un distintivo de expresión único, con el perfil proteómico de la muestra de referencia.

55 En los métodos de la presente divulgación el perfil proteómico de una muestra de ensayo biológica juega un papel 60 diagnóstico importante. Como se analiza anteriormente, si el perfil proteómico de la muestra de ensayo es esencialmente la misma que el perfil proteómico de la muestra biológica normal, el paciente es diagnosticado como que está libre de la afección materna/fetal patológica a ser identificada. Este diagnóstico "negativo" resulta de gran significancia, puesto que elimina la necesidad de someter al paciente a tratamiento o intervención innecesarios, lo que podría tener posibles efectos secundarios o podrían, de otro modo, poner al paciente, feto o neonato en riesgo. Los datos se analizan para determinar si las diferencias son estadísticamente significativas.

65 La sensibilidad de los métodos de diagnóstico de la presente divulgación puede mejorarse retirando las proteínas 60 encontradas en tanto el proteoma normal como el afectado en esencialmente los mismos niveles de expresión (proteínas comunes, tales como albúmina e inmunoglobulinas) antes del análisis usando métodos de separación de proteínas convencionales. La retirada de tales proteínas comunes, que no forman parte del distintivo de expresión única, da como resultado una sensibilidad mejorada y una precisión diagnóstica. Como alternativa o además, los 65 distintivos de expresión de las proteínas comunes pueden eliminarse (o se pueden eliminar las señales) durante el análisis informatizado de los resultados, normalmente usando algoritmos seleccionados espectrales, que están orientados a la máquina, para hacer llamadas de diagnóstico.

Los resultados que se detallan en los Ejemplos a continuación presentan perfil proteómicos característicos de infección intraamniótica (IAI) que difieren del perfil proteómico normal de flujo vaginal-cervical (FVC) de un modo estadísticamente significativo. Además, los Ejemplos presentan marcadores de expresión y distintivos de expresión única característicos de la IAI.

5 Un fluido biológico particularmente ventajoso para realizar métodos de diagnóstico no invasivos de la presente divulgación es el flujo vaginal-cervical (FVC). El FVC es un fluido biológico complejo que consiste en agua, electrolitos, compuestos orgánicos de bajo peso molecular (glucosa, aminoácidos y lípidos), células (leucocitos, linfocitos y células epiteliales) y una multitud de proteínas y enzimas proteolíticas que están predominantemente sintetizadas por el endocérvid (Blandau et al., *The Biology of the cervix*. University of Chicago Press: Chicago, 1973; p xi, 450p. El FVC también contiene secreciones de células vaginales, que incluye mucinas, defensinas, factores de complemento, inmunoglobulinas, lactoferrina y colectinas (Blandau et al., supra). El FVC fluye por todo el tracto reproductivo femenino y lo lubrica, incluyendo la vagina, áreas cervicales y uterinas. El FVC forma la primera línea de defensa frente a patógenos externos, señales de fertilidad y ayuda en la inseminación, embarazo y parto (Blandau et al., supra; Bigelow, J. F. et al., *Hum Reprod* 2004, 19, (4), 889-92). El FVC contiene flora tal como Lactobacilli crispatus y Lactobacilli vaginalis. Las secreciones de esta flora aportan un bajo pH al FVC, que mejora su actividad antipatógena (Blandau et al., supra). Cualquier desequilibrio en la flora vaginal o invasión de flora externa resulta en vaginosis bacteriana. En respuesta a la vaginosis bacteriana, la secreción de varias citocinas tales como IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-6 y TNF- α el FVC por el endoepitelio vaginal y cervical cambia (Mattsby-Baltzer, I et al., *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998, 77, (7), 701-6; Eschenbach, D. A. et al., *J Clin Microbiol* 1989, 27, (2), 251-6). La imposibilidad de frenar la vaginosis bacteriana se ha correlacionado positivamente con cáncer cervical (Mikamo, H et al., *J Infect Chemother* 1999, 5, (2), 82-85), enfermedad inflamatoria pélvica (Ness, R. B. et al., *Am J Epidemiol* 2005, 162, (6), 585-90.), endometritis (Haggerty, C. L. et al., *Clin Infect Dis* 2004, 39, (7), 990-5; Morris, M. et al., *Bjog* 2001, 108, (5), 439-50) e infertilidad tubárica (Morris et al., supra). La vaginosis bacteriana en mujeres embarazadas se ha correlacionado con un riesgo aumentado de parto prematuro y nacimiento prematuro (Gravett, M. G. et al., *Jama* 1986, 256, (14), 1899-903).

30 Las citocinas y otras moléculas de defensa presentes en el FVC juegan un papel importante en la infección, replicación y proliferación de virus de inmunodeficiencia transmitidos sexualmente tales como VIH y virus del herpes simple (VHS) en la vagina (Poli, G. et al., *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992, 8, (2), 191-7; Zara, F. et al., *Sex Transm Infect* 2004, 80, (2), 108-12; John, M. et al., *J Infect Dis* 2005, 192, (10), 1731-40). El análisis de la fracción polipeptídica catiónica del FVC ha identificado 20 polipéptidos que contribuyen en la actividad anti-VIH (Venkataraman, N. et al., *J Immunol* 2005, 175, (11), 7560-7). Estudios previos también han identificado un papel del FVC en la captura de viriones del VIH, previniendo, de este modo, la infección (Maher, D. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102, (32), 11504-9; Quinones-Mateu, M. E et al., *Aids* 2003, 17, (16), F39-48). Estudios recientes han detectado una correlación entre varias moléculas de respuesta inmune y FVC y la incidencia de ruptura prematura de las membranas (PROM) subclínica, que lleva a el nacimiento prematuro (Helmig, B. R. et al., *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002, 12, (4), 237-46; Ogino, M. et al., *J Obstet Gynaecol Res* 2005, 31, (5), 421-6). Durante el embarazo, el FVC podría contener fluido amniótico (FA) derivado del útero, bien debido a la interrupción o secreciones paralelas de la interfaz coriónica-decidua. Esta "fuga" de FA en el FVC proporciona la base para el diagnóstico no invasivo actual para la presencia de fibronectina fetal, que se ha usado para predecir el parto prematuro en mujeres (Swamy, G. K. et al., *J Reprod Med* 2005, 50, (11), 851-6).

45 45 El FVC es un sitio de diagnóstico potencial importante para controlar la salud materna y fetal en mujeres embarazadas debido a su método de recogida mínimamente invasivo en comparación con FA, es decir, amniocentesis. Las combinaciones de biomarcadores identificados en el presente documento proporcionan una herramienta de diagnóstico valiosa en la detección fiable de infección intraamniótica en un sujeto en estado de embarazo.

50 50 Los métodos estadísticos para comparar perfiles proteómicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el caso de un espectro de masas, el perfil proteómico se define mediante los valores de amplitud máximos en posiciones de masa/carga (M/Z) clave a lo largo del eje horizontal del espectro. Por consiguiente, un perfil proteómico característico puede, por ejemplo, caracterizarse por el patrón formado por la combinación de amplitudes espectrales en valores de M/Z dados. La presencia o ausencia de un distintivo de expresión característico o la identidad sustancial de dos perfiles puede determinarse cotejando el perfil proteómico (patrón) de una muestra de ensayo con el perfil proteómico (patrón) de una muestra de referencia o normal, con un algoritmo apropiado. Se desvela un método estadístico para analizar patrones proteómicos, por ejemplo, *In Antibiotics III*, et al., *The Lancet* 359:572-77 (2002); Issaq et al., *Biochem Biophys Commun* 292:587-92 (2002); Ball et al., *Bioinformatics* 18:395-404 (2002); y Li et al., *Clinical Chemistry Journal*, 48:1296-1304 (2002).

60 60 4. Matrices de proteínas

65 65 Tanto los ensayos de diagnóstico como de identificación descritos anteriormente pueden llevarse a cabo usando matrices de proteínas. En los últimos años, las matrices de proteínas han ganado un amplio reconocimiento como medio potente para detectar proteínas, controlar sus niveles de expresión e investigar las interacciones y funciones de las proteínas. Estas permiten un análisis de proteínas de alto rendimiento, cuando grandes cantidades de

determinaciones pueden realizarse simultáneamente, usando medios automáticos. La micromatriz o formato de chip, que se ha desarrollado originalmente para matrices de ADN, tales determinaciones pueden llevarse a cabo con un uso mínimo de materiales mientras que genera grandes cantidades de datos.

- 5 Aunque el análisis de proteomas mediante electroforesis en gel 2D y espectrometría de masas es muy eficaz, no siempre proporciona la elevada sensibilidad necesaria y esto puede perder muchas proteínas que se expresan en baja abundancia. Las micromatrices de proteínas, además de su elevada eficacia, proporcionan una sensibilidad mejorada.
- 10 Las disposiciones de proteínas se forman inmovilizando proteínas sobre una superficie sólida, tal como vidrio, silicio, micro-pocillos de plástico, nitrocelulosa, membranas de PVDF y microperlas, usando varios procedimientos de química de unión covalentes y no covalentes bien conocidos en la técnica. El soporte sólido debe ser químicamente estable antes y después del procedimiento de acoplamiento, proporcionar una buena morfología de manchas, mostrar una unión no específica mínima, no debe contribuir un antecedente en los sistemas de detección y debe ser compatible con distintos sistemas de detección.
- 15

En general, las micromatrices de proteínas usan los mismos métodos de detección comúnmente usado para la lectura de matrices de ADN. De manera similar, la misma instrumentación que se usa para leer micromatrices de ADN es aplicable a matrices de proteínas.

- 20 Por lo tanto, las matrices de captura (por ejemplo, matrices de anticuerpos) pueden sondarse con proteínas marcadas fluorescentemente a partir de dos fuentes distintas, tales como fluidos biológicos normales y afectados. En este caso, la lectura se basa en la carga en la señal fluorescente como un reflejo de los cambios en el nivel de expresión de una proteína diana. Lecturas alternativas incluyen, sin limitación, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, resonancias plasmónica de superficie, amplificación del ADN de círculo rodante, dispersión de luz de resonancia, reacciones enzimáticas y microscopía de fuerza atómica.
- 25

Para más detalles, véase, por ejemplo, Zhou H, et al., Trends Biotechnol. 19:S34-9 (2001); Zhu et al., Current Opin. Chem. Biol. 5:40-45-(2001); Wilson and Nock, Angew Chem Int Ed Engl 42:494-500 (2003); and Schweitzer and Kingsmore, Curr Opin Biotechnol 13:14-9 (2002). Biomolecule arrays are also disclosed in U.S. Pat. No. 6,406,921, publicada el 18 de junio de 2002.

5. Inmunoensayos

- 35 Los ensayos de diagnóstico de la presente divulgación también pueden llevarse a cabo en la forma de diversos formatos de inmunoensayo, que son bien conocidos en la técnica. Una realización de la divulgación incluye métodos para diagnósticas infección intraamniótica en un individuo, que comprende las etapas de obtener un fluido corporal, *por ejemplo*, flujo vaginal-cervical, de un individuo; medir una cantidad de una o más proteínas descritas en el presente documento en el fluido corporal usando sistemas de inmunoensayo descritos en el presente documento; y comparar la cantidad de una o más proteínas descritas en el presente documento en el fluido corporal a un nivel de referencia de una o más proteínas descritas en el presente documento en individuos sanos sin la afección, donde una cantidad elevada de una o más proteínas descritas en el presente documento anteriormente el nivel de referencia indica que el individuo tiene infección intraamniótica.
- 40
- 45 En una realización, un ensayo de una etapa (incubación simultánea de muestra más anticuerpo de detección) es útil. En otra realización, un ensayo de dos etapas (incubación secuencial de muestra y el anticuerpo de detección) es útil. Es preferente un ensayo de dos etapas en el caso en el que otras moléculas de proteínas podrían competir para unirse al anticuerpo de detección. En inmunoensayos homogéneos, tanto la reacción inmunológica entre un antígeno y un anticuerpo como la detección se lleva a cabo en una reacción homogénea. Los inmunoensayos heterogéneos incluyen al menos una etapa de separación, que permite la diferenciación de productos de reacción a partir de reactivos no reaccionados.
- 50

55 En una realización de un inmunoensayo referido como ensayo inmunométrico, de "dos sitios" o "sándwich", el analito está unido a o intercalado entre dos anticuerpos que se unen a distintos epítopos sobre el analito. Ejemplos representativos de tales inmunoensayos incluyen inmunoensayos enzimáticos o ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (EIA o ELISA), ensayos inmunoradiométricos (IRMA), inmunoensayos de fluorescentes, ensayos de flujo lateral, inmunoensayos de difusión, ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de separación magnética (MSA). En un tal ensayo, un primer anticuerpo, que se describe como el anticuerpo "de captura", se une a un soporte sólido, tal como una superficie de acoplamiento de proteínas o de unión de proteínas, partículas de metal coloidales, partículas de óxido de hierro o perlas poliméricas. Un ejemplo de una perla polimérica es una partícula de látex. En dicha realización, el anticuerpo de captura está unido a o revestido sobre un soporte sólido usando procedimientos conocidos en la técnica. Como alternativa, el anticuerpo de captura está acoplado con un ligando que es reconocido por un anticuerpo adicional que está unido a o revisto sobre un soporte sólido. La unión del anticuerpo de captura al anticuerpo adicional mediante el ligando inmoviliza, a continuación, el anticuerpo de captura sobre el soporte sólido. Un ejemplo de tal ligando es la fluoresceína.

60

65

- El segundo anticuerpo, que se describe como el anticuerpo "de detección", se acopla o conjuga con un marcador usando procedimientos conocidos en la técnica. Ejemplos de marcadores adecuados para este fin incluyen un agente quimiluminiscente, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un sustrato de una reacción enzimática, un agente fluorescente y un radioisótopo. En una realización, el marcador incluye una primera proteína tal como biotina acoplada con el segundo anticuerpo, y una segunda proteína tal como estreptavidina que está acoplada con una enzima. La segunda proteína se une a la primera proteína. La enzima produce una señal detectable cuando se proporciona con el/los sustrato(s), de modo que la cantidad de señal medida se corresponde con la cantidad del segundo anticuerpo que está unido al analito. Ejemplos de enzimas incluyen, sin limitación, fosfatasa alcalina, amilasa, luciferasa, catalasa, beta-galactosidasa, glucoxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, peroxidasa de rábano picante, lactamasa, ureasa y malato deshidrogenasa. Sustratos adecuados incluyen, sin limitación, TMB ((3,3',5,5'-tetrametil-bencidina, OPD (o-fenileno diamina) y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfónico).
- En el formato "sándwich" el antígeno que se está sometiendo a ensayo se mantiene entre dos anticuerpos distintos. En este método, en primer lugar, se reviste una superficie sólida con un anticuerpo de fase sólida. La muestra de ensayo, que contiene el antígeno (es decir, una proteína de diagnóstico) o una composición que contiene el antígeno, que se está midiendo, se añade, a continuación, y el antígeno se deja reaccionar con el anticuerpo unido. Cualquier antígeno no unido se elimina por lavado. Una cantidad conocida de anticuerpo marcado con enzima se deja reaccionar a continuación con el antígeno unido. Cualquier anticuerpo unido a enzima no unido en exceso de eliminada por lavado después de la reacción. El sustrato para la enzima usada en el ensayo se añade a continuación y la reacción entre el sustrato y la enzima produce un cambio de color. La cantidad de cambio de color visual es una medición directa de anticuerpo unido conjugado con enzima específico y consiguientemente el antígeno presente en la muestra sometida a ensayo.
- El ELISA también puede usarse como ensayo de competición. En el formato de ensayo de competición, el espécimen de ensayo que contiene el antígeno a determinar se mezcla con una cantidad precisa de antígeno marcado con enzima y ambos compiten por unirse a un anticuerpo anti-antígeno unido a una superficie sólida. El exceso de antígeno marcado con enzima libre se lava antes de que se añada el sustrato para la enzima. La cantidad de intensidad de color resultante de la interacción enzima-sustrato es una medición de la cantidad de antígeno en la muestra sometida a ensayo. Los inmunoensayos homogéneos incluyen, por ejemplo, la Técnica de Inmunoensayo de Enzimas Multiplicadas (EMIT), que normalmente incluye una muestra biológica que comprende el compuesto o compuestos a medir, moléculas marcadas con enzima del/ de los compuesto(s) a medir, anticuerpo específico o anticuerpos que se unen al/ a los compuesto(s) a medir y un sustrato cromogénico de enzima específico. En una EMIT típica se añade exceso de anticuerpos específicos a una muestra biológica. Si la muestra biológica contiene las proteínas a detectar, tales proteínas se unen a anticuerpos. Una cantidad medida de las proteínas marcadas con enzima correspondientes se añade a continuación a la mezcla. Los sitios de unión de anticuerpos no ocupados por moléculas de la proteína en la muestra se ocupan con moléculas de la proteína marcada con enzima añadida. Como resultado, la actividad enzimática se reduce puesto que solo la proteína marcada con enzima libre puede actuar sobre el sustrato. La cantidad de sustrato convertido de una forma incolora a una forma colora determina la cantidad de enzima libre sobrante en la mezcla. Una elevada concentración de la proteína a detectar en la muestra causa lecturas de absorbancia superiores. Una menor proteína en la muestra resulta en una actividad enzimática inferior y consiguientemente lecturas de absorbancia inferiores. La inactivación del marcador de enzima cuando el complejo Ag-enzima está Ab-unido hace que el EMIT un sistema único, permitiendo que el ensayo se realice sin la separación de compuestos unidos y no unidos según sea necesario con otros métodos de inmunoensayo.
- Anticuerpos útiles en las diversas realizaciones de los sistemas y métodos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos disponibles en el mercado, así como cualquier anticuerpo novedoso generado para unir un epítopo adecuado sobre la proteína diana designada. En todas las realizaciones, los anticuerpos a usar según la presente divulgación deben unir la una o más isoformas específicas de los biomarcadores descritas en el presente documento que están presentes en el flujo vaginal-cervical. Los anticuerpos usados en diversas realizaciones ilustrados en el presente documento son monoclonales o policlonales en la naturaleza. Otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, tales como anticuerpos recombinantes, anticuerpos químicos, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab o Fv, así como fragmentos seleccionados identificando bibliotecas de muestra de fagos y similares también son útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento.
- Los métodos para la preparación de anticuerpos monoclonales así como policlonales están ahora bien establecidos (Harlow E. et al., 1988. *Antibodies*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory). En una realización, los anticuerpos se presentan frente a LBP recombinante humano, fragmentos sintéticos de los mismos o LBP, tal como pueden ser purificados a partir de suero humano. Se plantean anticuerpos policlonales en diversas especies incluyendo, pero sin limitación, ratón, rata, conejo, cabra, oveja, burro y caballo, usando procedimientos de inmunización estándar y de sangrado. Los sangrados de animal con elevados títulos se fraccionan mediante procedimientos de precipitación por sales selectivos rutinarios, tales como precipitación con sulfato de amonio y fracciones de inmunoglobulina específica separándose mediante cromatografía de afinidad sucesiva sobre columnas de Proteína-A-Sefarosa y leptina-Sefarosa, según métodos estándar. Los anticuerpos policlonales así como monoclonales purificados se caracterizan a continuación para su especificidad y falta de reactividad cruzada con moléculas relacionadas. Tal

caracterización se lleva a cabo mediante métodos estándar usando proteínas, por LBP, marcadas con indicadores tales como radioisótopo o biotina en competición con niveles en aumento de reactivos cruzados potenciales no marcados para la unión de anticuerpos. En algunas realizaciones, se requiere la purificación adicional para obtener fracciones de anticuerpos altamente específicas o para la selección de fracciones de anticuerpos de afinidad superior a partir de un grupo policlonal. En el caso de los anticuerpos monoclonales, se lleva cuidado en la selección de anticuerpos con buenas características de unión y especificidad no solo para el inmunógeno, sino también para las moléculas circulantes nativas, particularmente cuando se usa una molécula recombinante o antígeno de péptido para la inmunización. Los estudios de reactividad cruzada se evalúan adicionalmente mediante otros métodos estándar tales como la bien establecida electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y métodos de transferencia de Western en afecciones decrecientes y no decrecientes. La evaluación de inmunorreactividad proteínica detectada en las muestras de suero fraccionadas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) también se usa para definir aproximadamente el perfil de peso molecular de la proteína detectada (Gravett M G, et al., JAMA 2004; 292:462-469; Khosravi M J et al., Clin Biochem 1995; 28:407-414).

5 Se preparan anticuerpos monoclonales según a procedimiento de laboratorio estándar bien establecidos ("Practice and Theory of Enzyme Immunoassays" by P. Tijssen (In Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Eds: R. H. Burdon and P. H. van Kinuppenberg; Elsevier Publishers Biomedical Division, 1985)), que se basan en la técnica original de Kohler y Milstein (Kohler G, Milstein C. Nature 256:495, 1975). Esta técnica se lleva a cabo retirando células del bazo de animales inmunizados e inmortalizando las células productoras de anticuerpos mediante fusión con células de mieloma o mediante transformación de virus Epstein Barr, y a continuación identificando clones que expresen el anticuerpo deseado, aunque también se usan otras técnicas conocidas en la técnica. También se producen anticuerpos mediante otros planteamientos conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación a la inmunización con ADN específico.

10 15 Para su uso en los inmunoensayos descritos en el presente documento, los anticuerpos se purifican usando esquemas de purificación de anticuerpos estándar. En diversas realizaciones, tanto los anticuerpos monoclonales como policlonales se purifican mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de Proteína-A. Como alternativa, los anticuerpos se purifican mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de gel que contiene proteína de antígeno inmovilizada usando métodos estándar.

20 25 30 Otra consideración para la selección del anticuerpo apropiado para su uso en los sistemas y métodos descritos en el presente documento es la capacidad del anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección en unirse simultáneamente a una molécula de proteína dada. En una realización que implica un MIP1b, por ejemplo, el sitio de unión de anti-MIP1b del anticuerpo de captura es distinto del epítopo al cual se une el anticuerpo de detección, permitiendo de este modo la unión simultánea de los anticuerpos de captura y detección y detección del marcador específico. En el caso de superposición significativa de epítopos y una respuesta de unión resultante pobre, resulta comprensible para un experto en la técnica seleccionar un anticuerpo distinto al biomarcador como el anticuerpo de captura o de detección. En algunas realizaciones un sitio de unión de anticuerpos no está completamente disponible sobre la superficie de la proteína, por ejemplo, cuando la proteína está principalmente presente en la muestra en un complejo con una o más proteínas y es menos accesible para unirse a los anticuerpos de captura o de detección. En tal circunstancia, las técnicas conocidas en la materia se usan para exponer los sitios de unión de anticuerpos, tales como desnaturalización de proteínas parcial o modificación de tampón.

35 40 45 Como se conoce en la técnica, el anticuerpo de captura se acopla con o se enlaza a diversos soportes de fase sólida usando métodos de unión covalente o no covalente estándar, dependiendo de los requisitos de separación analíticos y/o de fase sólida. El soporte sólido se encuentra en la forma de tubos de ensayo, perlas, micropartículas, papel de filtro, membranas, filtros de vidrio, partículas magnéticas, virutas de vidrio o silicio u otros materiales y enfoques conocidos por los expertos en la técnica. El uso de micropartículas, particularmente partículas magnetizables, se han revestido directamente con el anticuerpo (anticuerpo de captura de partículas magnéticas) o partículas que se han marcado con un enlazador universal (por ejemplo, avidina o anticuerpo antiespecie) son útiles para acortar significativamente el tiempo de incubación del ensayo. Esto junto con otros enfoques alternativos conocidos en la técnica permiten una finalización del ensayo a los minutos sin limitar la sensibilidad requerida. El uso de partículas magnetizables o enfoques similares permiten la automatización conveniente de la tecnología en los inmunoanalizadores ampliamente disponibles.

50 55 60 65 El anticuerpo de detección usado para la detección del fragmento de proteína está o bien directamente acoplado con una molécula indicadora o está indirectamente detectado mediante un sistema de detección secundario. Este último se basa en varios principios distintos conocidos en la técnica, incluyendo reconocimiento de anticuerpos mediante un anticuerpo antiespecie marcado y otras formas de puentes de unión inmunológicos o no inmunológicos y sistemas de detección de amplificación de señal (por ejemplo, la tecnología de biotina-estreptavidina). El enfoque de amplificación de señales se usa para aumentar significativamente la sensibilidad del ensayo y el bajo nivel de reproducibilidad y rendimiento. El marcador usado para el acoplamiento de anticuerpo directo o indirecto es cualquier molécula indicadora detectable. Ejemplos de marcadores adecuados son aquellos ampliamente usados en el campo de los sistemas de detección inmunológicos o no inmunológicos, tales como fluoróforos, marcadores luminiscentes, complejos de metal y marcadores radioactivos, así como restos que podrían detectarse mediante otros reactivos adecuados tales como enzimas o diversas combinaciones de marcadores directos o indirectos tales

como enzimas con sustratos luminogénicos.

En diversas realizaciones de los métodos de la divulgación, cualquier volumen de muestra o anticuerpo y tiempos de incubación se pueden alterar dentro de la experiencia del experto en la técnica. Estos métodos y sistemas incluyen 5 modificaciones comunes usadas en inmunoensayos convencionales y cualquier modificación conocida por el experto en la técnica. En diversas realizaciones, el diseño del ensayo es homogéneo o heterogéneo, dependiendo de la aplicación particular del ensayo y la necesidad de velocidad, sensibilidad, precisión y conveniencia.

Además de los inmunoensayos descritos anteriormente, otros inmunoensayos (por ejemplo, placas de Ouchterlony o 10 transferencias de Western puede realizarse sobre geles de proteínas o manchas de proteínas sobre filtros) son conocidos en la técnica y pueden encontrar uso como diagnóstico.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit de inmunoensayo. En una realización, el kit de 15 inmunoensayo comprende anticuerpos y reactivos para la detección de dos o más proteínas descritas en el presente documento. En un aspecto, la divulgación incluye un kit de inmunoensayo sándwich que comprende un anticuerpo de captura y un anticuerpo detector. El anticuerpo de captura y el anticuerpo detector puede ser monoclonal o políclonal. En otro aspecto, la divulgación incluye un kit de diagnóstico que comprende dispositivos de flujo lateral, tales como ensayos de tira inmunocromatográfica (ICS), usando inmunocromatografía de flujo. Los dispositivos de flujo lateral emplean técnicas de ensayo de flujo lateral tal como se describe generalmente en las patentes de los 20 Estados Unidos n.º 4.943.522; 4.861.711; 4.857.453; 4.855.240; 4.775.636; 4.703.017; 4.361.537; 4.235.601; 4.168.146; 4.094.647. En otro aspecto más, el kit de inmunoensayo puede comprender, por ejemplo, en recipientes separados (a) anticuerpos monoclonales que tienen especificidad de unión para polipéptidos usados en el diagnóstico de una afección materna/fetal particular, tal como sepsis neonatal; (b) inmunoglobulinas de anticuerpos. 25 El kit de inmunoensayo puede utilizarse para la práctica de los diversos métodos proporcionados en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales y las inmunoglobulinas de anticuerpos pueden proporcionarse en una cantidad de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 gramos, y más preferentemente aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 gramo. La inmunoglobulina de anticuerpo puede ser una inmunoglobulina políclonal, proteína A o proteína G o fragmentos funcionales de las mismas, que puede marcarse antes de su uso mediante métodos conocidos en la técnica. El kit de diagnóstico puede incluir adicionalmente cuando sea necesario agentes 30 para reducir la interferencia de fondo en un ensayo, agentes para aumentar la señal, software y algoritmos para combinar e interpolar valores de marcador para producir una predicción del resultado clínico de interés, aparato para realizar un ensayo, curvas y diagramas de calibración, curvas y diagramas de estandarización y similares. Este kit de ensayo puede empaquetarse de cualquier modo adecuado, normalmente con todos los elementos en un único recipiente junto con una hoja de instrucciones impresas para llevar a cabo el ensayo.

35 **6. Métodos de diagnóstico y de tratamiento**

Los métodos de diagnóstico de la presente divulgación son herramientas valiosas para médicos practicantes para realizar rápidas decisiones de tratamiento, que son a menudo críticas para la supervivencia del niño y/o la madre. 40 Por lo tanto, por ejemplo, si una mujer embarazada muestra síntomas de parto prematuro, es importante realizar un ensayo de diagnóstico para determinar si hay presente infección intraamniótica. Si el ensayo de diagnóstico rápido y no invasivo del presente documento confirma la presente de infección intraamniótica, el médico necesita tomar medidas inmediatas para mejorar las posibilidades de supervivencia del niño prematuro y liminar los riesgos de la salud de la madre. Actualmente no hay disponible ensayos invasivos para la infección intraamniótica.

45 Si el ensayo de infección intraamniótica es negativo, la cuestión de si aún se puede producir un parto prematuro permanece. Actualmente, a veces se usa un ensayo de fibronectina fetal (fFN) de marcador único para este fin. La ausencia de fFN en el FVC de la paciente embarazada es un buen indicador de que el embarazo continuará durante al menos dos semanas más. Sin embargo, basándose en la presencia de fFN (ensayo positivo), no es posible predecir fielmente si es posible que se produzca un nacimiento prematuro. Los ensayos de diagnóstico multimarcador de la presente divulgación proporcionan predictores fieles de la posibilidad de parto prematuro tanto en el caso de resultados de ensayo negativos y positivos.

55 Como alternativa, si un paciente muestra síntomas de parto prematuro y se usa un ensayo diagnóstico (bien un ensayo del presente documento o cualquier otro ensayo usado en la práctica clínica) para evaluar la posibilidad de parto prematuro, puede realizarse un ensayo para la infección intraamniótica como seguimiento, para proporcionar información respecto a la presencia o ausencia de infección intraamniótica y permitir al médico realizar mejores decisiones de tratamiento.

60 Después de la medición u obtención de los niveles de expresión de las proteínas identificadas en el presente documento, los resultados de ensayo, hallazgos, diagnósticos, predicciones y/o recomendaciones de tratamiento se registran normalmente y se comunican a los técnicos, médicos y/o pacientes, por ejemplo. En determinadas realizaciones, se usarán ordenadores para comunicar tal información a las partes interesadas, tal como, pacientes y/o el médico interviniendo. En algunas realizaciones, los ensayos se realizarán o los resultados de ensayo se analizarán en un país o jurisdicción que difiera del país o jurisdicción al cual los resultados o diagnósticos van a comunicarse.

- En una realización preferida, un diagnóstico, predicción y/o recomendación de tratamiento basada en el nivel de expresión en un sujeto de ensayo de uno o más biomarcadores en el presente documento se comunica al sujeto tan pronto como sea posible después de que se complete el ensayo y se genere el diagnóstico y/o predicción. En determinadas realizaciones, el diagnóstico, predicción y/o recomendación de tratamiento se basa adicionalmente en signos y síntomas presentados por el sujeto. En una realización, los signos y síntomas que indican IAI incluyen, pero sin limitación, fiebre materna ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$), leucocitosis materna ($\geq 15.000 / \text{mm}^3$), taquicardia materna o fetal, sensibilidad uterina o fluido amniótico fétido. Otros signos y síntomas que indican IAI se conocen en la técnica. El uno o más biomarcadores identificados y cuantificados en los métodos descritos en el presente documento pueden contenerse en uno o más paneles. El número de biomarcadores que comprenden un panel puede incluir 1 biomarcador, 2 biomarcadores, 3 biomarcadores, 4 biomarcadores, 5 biomarcadores, 6 biomarcadores, 7 biomarcadores, 8 biomarcadores, 9 biomarcadores, 10 biomarcadores, 11 biomarcadores, 12 biomarcadores, 13 biomarcadores, 14 biomarcadores, 15 biomarcadores, 16 biomarcadores, 17 biomarcadores, 18 biomarcadores, 19 biomarcadores, 20 biomarcadores, etc.
- En una realización preferida, la divulgación se refiere a un ensayo de infección intraamniótica (ensayo de infección intraamniótica ProteoGenix (PG-IAI)), que es un ensayo inmunocromatográfico que mide la α -fetoproteína, interleucina-6 (IL-6) y las concentraciones de proteína de unión al factor de crecimiento de insulina-1 (IGFBP-1) en flujo vaginal-cervical (FVC). El ensayo es particularmente útil como una ayuda en la evaluación del riesgo de IAI en mujeres embarazadas con parto prematuro idiopático, membranas intactas y muestradas entre las 22 semanas 0 días y las 36 semanas 6 días y puede usarse para priorizar el tratamiento del paciente para aquellos que se sospecha que tienen IAI.
- En una realización particular, el ensayo se aloja en un cartucho de flujo lateral, y las intensidades de señal del biomarcador PG-IAI se miden usando un lector de flujo lateral. El FVC se recoge usando un hisopo de FVC no invasivo usando un kit de recogida de hisopo.
- Los datos de estudios clínicos/analíticos actuales que usan una plataforma ELISA se usaron para el rendimiento del ensayo aproximado para el dispositivo de flujo lateral. El mejor modelo usó concentraciones de masas de dos biomarcadores de FVC, α -fetoproteína e IL-6. El biomarcador de FVC adicional, IGFBP1, se ha identificado que sirve como un vigilante para la evaluación de riesgo de dos biomarcadores. Mientras que el IGFBP1 puede que no sea un diagnóstico de IAI por sí mismo, rechaza un 29 % de resultados de paciente de falso positivo de IAI y mejora en gran medida la especificidad del ensayo de diagnóstico.
- Los resultados y/o información relaciones puede comunicarse al sujeto por el médico que trata al sujeto. Como alternativa, los resultados pueden comunicarse directamente a un sujeto de ensayo mediante cualquier medio de comunicación, que incluye, por escrito, tal como mediante un informe por escrito, formas electrónicas de comunicación, tales como correo electrónico o teléfono. La comunicación puede facilitarse mediante el uso de un ordenador, tal como en el caso de comunicaciones por correo electrónico. En determinadas realizaciones, la comunicación que contiene los resultados de un ensayo de diagnósticos y/o conclusiones extraídas y/o recomendaciones de tratamiento basadas en el ensayo, puede generarse y suministrarse automáticamente al sujeto usando una combinación de hardware y software informatizado que resultará familiar a los expertos en las telecomunicaciones. Un ejemplo de un sistema de comunicación orientado al cuidado de la salud se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 6.283.761; sin embargo, la presente divulgación no se limita a métodos que utilizan este sistema particular de comunicación. En determinadas realizaciones de los métodos de la divulgación, todas o algunas de las etapas del método, incluyendo el análisis de muestras, diagnósticos de enfermedades y comunicación de los resultados de ensayo o diagnósticos, puede llevarse a cabo en diversas (por ejemplo, extranjeras) jurisdicciones.
- Para facilitar el diagnóstico, los perfiles de referencia y/o de biomarcador del sujeto o nivel de expresión de uno o más de los biomarcadores presentados en el presente documento de la presente divulgación pueden presentarse sobre un dispositivo de visualización, contenidos electrónicamente o en un medio leíble por máquina, tales como, pero sin limitación, cintas análogas como las leíbles mediante un VCR, CD-ROM, DVD-ROM, un medio flash de USB, *por ejemplo*, memoria flash, entre otros. Tales medios leíbles por máquina también pueden contener resultados de ensayo adicionales, tal como, sin limitación, mediciones de parámetros clínicos y factores de riesgo de laboratorio tradicionales. Como alternativa o además, el medio leíble por máquina también puede comprender información del sujeto tal como el historial médico o cualquier historial familiar relevante.
- Microbiología y tratamiento:** La IAI es frecuentemente una infección polimicrobiana, que implica eubacterias, *mycoplasma* sp. y hongos. Los microorganismos más frecuentes recuperados mediante cultivo o PCR de ADNr 16S a partir de fluido amniótico en IAI incluyen *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides bivius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus* sp., *Prevotella bivius*, otros anaerobios Gram negativos, *Candida*, así como los micoplasmas genitales *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*. (DiGiulio DB, et al., PLoS ONE 3(8): e3056; Han, Yiping W. et al., J. Clin. Microbiol. 2009 47: 38-47). La terapia antibiótica dirigida debe iniciarse en el período intraparto, tan pronto se confirme el diagnóstico.

Ejemplos

El siguiente ejemplo tiene solamente fines ilustrativos, y no se pretende que limite el alcance de la presente divulgación en forma alguna. Un experto en la materia reconocerá varios parámetros que pueden alterarse dentro del alcance de divulgación.

Ejemplo 1

Identificación de biomarcadores de flujo vaginal-cervical de infección intraamniótica usando inmunoensayos

Se recogieron especímenes de paciente individuales a partir de pacientes que presentaban un parto prematuro. Se usaron especímenes de fluido amniótico iguales para clasificar los pacientes según presentaban infección intraamniótica (IAI) o sin IAI basándose en el cultivo de fluido amniótico (aerobio y anaerobio y *Mycoplasma sp*) y la presencia o ausencia de fluido amniótico de ADN ribosómico 16S.

Recogida de hisopo de flujo vaginal cervical. Se recogió flujo vaginal-cervical hisopando el orificio cervical con un bastoncillo de poliéster (Puritan, Guilford, ME), que a continuación se colocó en un recipiente con ~ 1 ml. de tampón de recogida de espécimen. Los especímenes se congelaron a -70 °C para su transporte, a continuación se descongelaron, centrifugaron durante 15 minutos a 270 x g y se volvieron a alicuotar para un almacenamiento a largo plazo.

GROalfa: Dilución de especímenes de FVC. Especímenes de flujo vaginal-cervical (FVC) se diluyeron 1:50 en Tampón de ensayo (2,67mM de KCl, 1,47mM de KH₂PO₄, 137,93mM de NaCl, 8,06mM de Na₂HPO₄-7H₂O, BSA al 0,15 %, 0,05 % v/v de Tween-20, 0,075 % v/v de ProClin 950, pH 7,3 + 0,3) antes del ensayo sobre el Kit de Inmunoensayo Quantikine Human CXCL1/GROOct tal como se describe a continuación.

Detección de GROalfa en especímenes de FVC. Después de la dilución, los especímenes se ejecutaron como muestras sobre el Kit de Inmunoensayo Quantikine Human CXCL1/GROOct de R&D Systems (Número de catálogo DGR00) con algunas modificaciones a las instrucciones del fabricante. En resumen, reactivos, controles y muestras se llevaron a temperatura ambiente (TA). El estándar de GROOct se reconstituyó con 5ml de tampón de ensayo, generando una solución de 1000 pg/ml. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. con agitación suave. Después de la incubación, 750 µl de la solución de 1000 pg/ml se diluyó en 750 µl de tampón de ensayo, generando una solución de 500 pg/ml. Este proceso se repitió cuatro veces adicionales, generando soluciones de 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, y 31,25 pg/ml. Se añadieron a cada pocillo 50 µl de diluyente de ensayo RD1U. Se añadieron 200 µl de estándares a pocillos adecuados por triplicado. Se añadieron 200 µl de controles y muestras a pocillos apropiados por duplicado. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 2h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron 3X con 400 µl IX de tampón de lavado con un 1 min. de incubación entre lavados usando el lavador de placas BioTek ELx50. Se retiró cualquier líquido residual dando golpes a los pocillos boca abajo sobre papel absorbente. Se añadieron a cada pocillo 200 µl de conjugado de GROOct. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a 2-8 °C durante 2 h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron como antes. Cualquier líquido residual se retiró como antes. Se añadieron a cada pocillo 200 µl de solución de sustrato. Los pocillos se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron a TA durante 20 min. Se añadieron a cada pocillo 50 µl de solución de parada. Se leyó la placa a 450 nm y 540 nm usando el lector de placas BioTek Synergy 2 y el software de BioTek Gen5.

Cuantificación de GROalfa en especímenes de FVC. Usando el software de Gen5, se realizaron cuatro parámetros de regresión no lineal para generar una curva estándar. Esta curva estándar se usó, a continuación, para calcular las concentraciones de GROalfa en los especímenes de FVC ejecutados sobre el kit de inmunoensayo. Para calcular las concentraciones finales de GROalfa en los especímenes de FVC, las concentraciones calculadas se multiplicaron por 50 para justificar la dilución de especímenes inicial. Cualquier especímen que tuviera las lecturas de DO Delta (DO450-DO540) inferior a la lectura de DO Delta del estándar de 31,25 pg/ml se asignó a una concentración de 31,25 pg/ml, que se multiplicó, a continuación, por 50. A continuación, los datos se analizaron usando métodos estadísticos tal como se describe a continuación. La Figura 1 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de GROalfa (Ensayo 1) en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

Dilución de especímenes de FVC. Especímenes de flujo vaginal-cervical (FVC) se diluyeron 1:100 en diluyente de calibrador RD6F antes del ensayo sobre el Kit de Inmunoensayo Quantikine Human IL-6 tal como se describe a continuación.

Detección de IL-6 en especímenes de FVC. Después de la dilución, los especímenes se ejecutaron como muestras sobre el Kit de Inmunoensayo Quantikine Human IL-6 de R&D Systems (Número de catálogo D6050) con algunas modificaciones a las instrucciones del fabricante. En resumen, reactivos, controles y muestras se llevaron a temperatura ambiente (TA). El estándar de IL-6 se reconstituyó con 5ml de diluyente de calibrador RD6F, generando una solución de 300 pg/ml. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. con agitación suave. Después de la incubación, se diluyeron 333 µl de la solución de 300 pg/ml en 667 µl del diluyente de calibrador

- RD6F, generando una solución de 100 pg/ml. se diluyeron 500 μ l de la solución de 100 pg/ml en 500 μ l del diluyente de calibrador RD6F, generando una solución de 50 pg/ml. Se repitieron diluciones de dos veces cuatro veces adicionales, generando soluciones de 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, y 3,12 pg/ml. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de diluyente de ensayo RD1W. Se añadieron 100 μ l de estándares a pocillos adecuados por triplicado. Se añadieron 100 μ l de controles y muestras a pocillos apropiados por duplicado. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 2h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron 4X con 400 μ l IX de tampón de lavado usando el lavador de placas BioTek ELx50. Se retiró cualquier líquido residual dando golpes a los pocillos boca abajo sobre papel absorbente. Se añadieron a cada pocillo 200 μ l de conjugado de IL-6. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 2h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron como antes. Cualquier líquido residual se retiró como antes. Se añadieron a cada pocillo 200 μ l de solución de sustrato. Los pocillos se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron a TA durante 20 ng. Se añadieron a cada pocillo 50 μ l de solución de parada. Se leyó la placa a 450 nm y 540 nm usando el lector de placas BioTek Synergy 2 y el software de BioTek Gen5.
- 15 **Cuantificación IL-6 en especímenes de FVC.** Usando el software de Gen5, se realizaron cuatro parámetros de regresión no lineal para generar una curva estándar. Esta curva estándar se usó, a continuación, para calcular las concentraciones de IL-6 en los especímenes de FVC ejecutados sobre el kit de inmunoensayo. Para calcular las concentraciones finales de IL-6 en los especímenes de FVC, las concentraciones calculadas se multiplicaron por 100 para justificar la dilución de especímenes inicial. Cualquier espécimen que tuviera las lecturas de DO Delta (DO450-DO540) inferiores a la lectura de DO Delta del estándar de 3,12 pg/ml se asignó a una concentración de 3,12 pg/ml, que se multiplicó, a continuación, por 100. Cualquier espécimen que tuviera las lecturas de DO Delta superiores a la lectura de DO Delta del estándar de 300 pg/ml se diluyó a diluciones superiores y se ejecutó sobre el kit de nuevo. A continuación, los datos se analizaron usando métodos estadísticos tal como se describe a continuación. La Figura 7 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de IL-6 en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).
- 30 **LBP: Dilución de especímenes de FVC.** Especímenes de flujo vaginal-cervical (FVC) se diluyeron 1:50 en Tampón de ensayo (2,67mM de KCl, 1,47mM de KH2P04, 137,93mM de NaCl, 8,06mM de Na2HPO4-7H2O, 0,15 % de BSA, 0,05 % v/v de Tween-20, 0,075 % v/v de ProClin 950, pH 7,3 + 0,3) antes del ensayo sobre el Kit ELISA Human LBP tal como se describe a continuación.
- 35 **Detección de LBP en especímenes de FVC.** Después de la dilución, los especímenes de ejecutaron como muestras sobre el Kit ELISA Human LBP de Cell Sciences (Número de catálogo CKH113) con algunas modificaciones a las instrucciones del fabricante. En resumen, reactivos, controles y muestras se llevaron a temperatura ambiente (TA). El estándar de LBP humano se reconstituyó con 30 μ l de agua destilada. El estándar de LBP humano reconstituido se diluyó a continuación en 1570 μ l de tampón de ensayo, generando una solución de 50 ng/ml. se diluyeron 350 μ l de la solución de 50 ng/ml en 350 μ l del tampón de ensayo, generando una solución de 25 ng/ml. Se repitieron diluciones de dos veces cuatro veces adicionales, generando soluciones de 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml, y 1,56 ng/ml. Se añadieron 100 μ l de estándares a pocillos adecuados por triplicado. Se añadieron 100 μ l de controles y muestras a pocillos apropiados por duplicado. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. con agitación. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron 3X con 300 μ l de tampón de lavado usando el lavador de placas BioTek ELx50. Se retiró cualquier líquido residual dando golpes a los pocillos boca abajo sobre papel absorbente. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de anticuerpo de detección. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. con agitación. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron como antes. Cualquier líquido residual se retiró como antes. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de solución de sustrato. Los pocillos se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron a TA durante 12-15 min. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de solución de parada. Se leyó la placa a 450 nm y 620 nm usando el lector de placas BioTek Synergy 2 y el software de BioTek Gen5. La Figura 8 ilustra el valor de logaritmo natural de LBP en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).
- 40 **Cuantificación de LBP en especímenes de FVC.** Usando el software de Gen5, se realizaron cuatro parámetros de regresión no lineal para generar una curva estándar. Esta curva estándar se usó, a continuación, para calcular las concentraciones de LBP en los especímenes de FVC ejecutados sobre el kit de inmunoensayo. Para calcular las concentraciones finales de LBP en los especímenes de FVC, las concentraciones calculadas se multiplicaron por 50 para justificar la dilución de especímenes inicial. Cualquier espécimen que tuviera las lecturas de DO Delta (DO450-DO620) inferiores a la lectura de DO Delta del estándar de 1,56 ng/ml se asignó a una concentración de 1,56 ng/ml, que se multiplicó, a continuación, por 50. Cualquier espécimen que tuviera las lecturas de DO Delta superiores a la lectura de DO Delta del estándar de 50 ng/ml se diluyó a diluciones superiores y se ejecutó sobre el kit de nuevo. A continuación, los datos se analizaron usando métodos estadísticos tal como se describe a continuación.
- 45 **A1AG: Dilución de especímenes de FVC.** Especímenes de flujo vaginal-cervical (FVC) se diluyeron 20 1:200 en PVS con 1 % de leche antes del ensayo sobre el Kit de cuantificación ELISA de Human Orosomucoid (alfa-1-glicoproteína ácida) tal como se describe a continuación.
- 50 **Detección de A1AG en especímenes de FVC.** Después de la dilución, los especímenes de ejecutaron como muestras sobre el Kit de cuantificación ELISA Human de Human Orosomucoid (alfa-1-glicoproteína ácida) de

GenWay (Número de catálogo 40-288-22927F) con algunas modificaciones a las instrucciones del fabricante. En resumen, reactivos, controles y muestras se llevaron a temperatura ambiente (TA). El anticuerpo de recubrimiento se diluyó a 5 μ g/ml en tampón de recubrimiento (0,05 M Carbonato-Bicarbonato, pH 9,4). se añadieron 100 μ l de esta solución de recubrimiento de 5 μ g/ml a Immuno LockWells con una superficie MaxiSorp (Nunc, número de catálogo 446469). Los pocillos se incubaron a TA durante 1h. y a continuación se lavaron 3X con 300 μ l de solución de lavado (50mM de Tris-HCl, 0,14 M de NaCl, 0,05 % de Tween 20) usando el lavador de placas BioTek ELx50. Se retiró cualquier líquido residual dando golpes a los pocillos boca abajo sobre papel absorbente. se añadieron 200 μ l de PBS con un 1 % de leche a cada pocillo y los pocillos se incubaron a TA durante 1h. Los pocillos se lavaron a continuación como antes y cualquier líquido residual se retiró como antes. El calibrador se diluyó a 250 ng/ml en PBS con un 1 % de leche. A continuación, se diluyeron 400 μ l de la solución de 250 ng/ml en 400 μ l de PBS con un 1 % de leche, generando una solución de 125 ng/ml. Se repitieron diluciones de dos veces cinco veces adicionales, generando soluciones de 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml, 15,625 ng/ml, 7,8125 ng/ml, y 3,90625 ng/ml. Se añadieron 100 μ l de estándares a pocillos adecuados por triplicado. Se añadieron 100 μ l de controles y muestras a pocillos apropiados por duplicado. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron 5X con 300 μ l de solución de lavado usando el lavador de placas BioTek ELx50. Cualquier líquido residual se retiró como antes. El conjugado de HRP se diluyó a 480 ng/ml en PBS con un 1 % de leche. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de conjugado de HRP diluido. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron como antes.

5 Los pocillos se incubaron a TA durante 1h. y a continuación se lavaron 3X con 300 μ l de solución de lavado (50mM de Tris-HCl, 0,14 M de NaCl, 0,05 % de Tween 20) usando el lavador de placas BioTek ELx50. Se retiró cualquier líquido residual dando golpes a los pocillos boca abajo sobre papel absorbente. se añadieron 200 μ l de PBS con un 1 % de leche a cada pocillo y los pocillos se incubaron a TA durante 1h. Los pocillos se lavaron a continuación como antes y cualquier líquido residual se retiró como antes. El calibrador se diluyó a 250 ng/ml en PBS con un 1 % de leche. A continuación, se diluyeron 400 μ l de la solución de 250 ng/ml en 400 μ l de PBS con un 1 % de leche, generando una solución de 125 ng/ml. Se repitieron diluciones de dos veces cinco veces adicionales, generando soluciones de 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml, 15,625 ng/ml, 7,8125 ng/ml, y 3,90625 ng/ml. Se añadieron 100 μ l de estándares a pocillos adecuados por triplicado. Se añadieron 100 μ l de controles y muestras a pocillos apropiados por duplicado. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron 5X con 300 μ l de solución de lavado usando el lavador de placas BioTek ELx50. Cualquier líquido residual se retiró como antes. El conjugado de HRP se diluyó a 480 ng/ml en PBS con un 1 % de leche. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de conjugado de HRP diluido. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron como antes.

10 Los pocillos se incubaron a TA durante 1h. y a continuación se lavaron 3X con 300 μ l de solución de lavado (50mM de Tris-HCl, 0,14 M de NaCl, 0,05 % de Tween 20) usando el lavador de placas BioTek ELx50. Se retiró cualquier líquido residual dando golpes a los pocillos boca abajo sobre papel absorbente. se añadieron 200 μ l de PBS con un 1 % de leche a cada pocillo y los pocillos se incubaron a TA durante 1h. Los pocillos se lavaron a continuación como antes y cualquier líquido residual se retiró como antes. El calibrador se diluyó a 250 ng/ml en PBS con un 1 % de leche. A continuación, se diluyeron 400 μ l de la solución de 250 ng/ml en 400 μ l de PBS con un 1 % de leche, generando una solución de 125 ng/ml. Se repitieron diluciones de dos veces cinco veces adicionales, generando soluciones de 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml, 15,625 ng/ml, 7,8125 ng/ml, y 3,90625 ng/ml. Se añadieron 100 μ l de estándares a pocillos adecuados por triplicado. Se añadieron 100 μ l de controles y muestras a pocillos apropiados por duplicado. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron 5X con 300 μ l de solución de lavado usando el lavador de placas BioTek ELx50. Cualquier líquido residual se retiró como antes. El conjugado de HRP se diluyó a 480 ng/ml en PBS con un 1 % de leche. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de conjugado de HRP diluido. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron como antes.

15 Los pocillos se incubaron a TA durante 1h. y a continuación se lavaron 3X con 300 μ l de solución de lavado (50mM de Tris-HCl, 0,14 M de NaCl, 0,05 % de Tween 20) usando el lavador de placas BioTek ELx50. Se retiró cualquier líquido residual dando golpes a los pocillos boca abajo sobre papel absorbente. se añadieron 200 μ l de PBS con un 1 % de leche a cada pocillo y los pocillos se incubaron a TA durante 1h. Los pocillos se lavaron a continuación como antes y cualquier líquido residual se retiró como antes. El calibrador se diluyó a 250 ng/ml en PBS con un 1 % de leche. A continuación, se diluyeron 400 μ l de la solución de 250 ng/ml en 400 μ l de PBS con un 1 % de leche, generando una solución de 125 ng/ml. Se repitieron diluciones de dos veces cinco veces adicionales, generando soluciones de 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml, 15,625 ng/ml, 7,8125 ng/ml, y 3,90625 ng/ml. Se añadieron 100 μ l de estándares a pocillos adecuados por triplicado. Se añadieron 100 μ l de controles y muestras a pocillos apropiados por duplicado. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron 5X con 300 μ l de solución de lavado usando el lavador de placas BioTek ELx50. Cualquier líquido residual se retiró como antes. El conjugado de HRP se diluyó a 480 ng/ml en PBS con un 1 % de leche. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de conjugado de HRP diluido. Los pocillos se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron a TA durante 1h. La tira adhesiva se retiró y los pocillos se lavaron como antes.

20 Cualquier líquido residual se retiró como antes. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de 1-Step Ultra TMB ELISA (Thermo Scientific, número de catálogo 34028). Los pocillos se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron a TA durante 2,75 min. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de reactivo de parada para sustrato de TMB (Sigma, número de catálogo S5814-100ml). Se leyó la placa a 450 nm usando el lector de placas BioTek Synergy 2 y el software de BioTek Gen5. La Figura 6 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de A1AG en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95).

25

Cuantificación A1AG en especímenes de FVC. Usando el software de Gen5, se realizaron cuatro parámetros de regresión no lineal para generar una curva estándar. Esta curva estándar se usó, a continuación, para calcular las concentraciones de A1AG en los especímenes de FVC ejecutados sobre el kit de inmunoensayo. Para calcular las 30 concentraciones finales de A1AG en los especímenes de FVC, las concentraciones calculadas se multiplicaron por 200 para justificar la dilución de especímenes inicial. Cualquier espécimen que tuviera lecturas de DO450 inferiores a la lectura de DO450 del estándar de 3,90625 ng/ml se asignó a una concentración de 3,90625 ng/ml, que se multiplicó, a continuación, por 200.

35 Cualquier espécimen que tuviera lecturas de DO450 superiores a la lectura de DO450 del estándar de 250 ng/ml se diluyó a diluciones superiores y se ejecutó sobre el kit de nuevo. A continuación, los datos se analizaron usando métodos estadísticos tal como se describe a continuación.

Detección y cuantificación de MIP-1beta, AFP, B2MG, MCP-1, TIMP-1 y VCAM-1 en especímenes de FVC. Se 40 contrató un ensayo de laboratorio externo (Rules Based Medicine) para determinar las concentraciones de MIP-1beta, AFP, B2MG, MCP-1, TIMP-1 y VCAM-1 en especímenes de FVC usando una tecnología de inmunoensayo multiplexado (Luminex xMAP). Los datos proporcionados por el laboratorio del ensayo se analizaron usando métodos estadísticos tal como se describe a continuación. La Figura 2 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de MIP 1b en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95). La 45 Figura 3 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de MCP-1 en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95). La Figura 4 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de B2MG en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95). La Figura 5 ilustra diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de TIMP-1 en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95). Diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de AFP 50 en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95) se ilustran en la Figura 9. Diagramas de caja que muestran el valor de logaritmo natural de VCAM-1 en pacientes infectados por IAI (n=14) frente a no infectados por IAI (n=95) se ilustran en la Figura 10.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE DATOS. Se llevaron a cabo comparaciones de biomarcadores individuales como sigue: Se 55 agruparon sujetos con estado infectado frente a no infectado mediante definición de referencia de compuestos. Se realizó un ANOVA en un sentido para comparar grupos que usaban datos transformados por log para reducir la influencia de los valores extremos. A continuación, se llevó a cabo un ensayo basado en el rango de Wilcoxin para comparar los grupos. Finalmente, se generaron curvas receptor-operador características (ROC) para evaluar la capacidad discriminatoria.

60 Se combinaron biomarcadores en modelos que usaban regresión logística. Los marcadores con $p<0,20$ sobre el ensayo de Wilcoxin se consideraron modelos multimarcador. Las curvas ROC basadas en modelo se crearon y usaron para comparar el rendimiento de marcadores individuales con respecto a modelos multimarcador. El intento fue maximizar el área bajo la curva de ROC y asegurar que las curvas cumplían los criterios mínimamente aceptables del 80 % de sensibilidad y especificidad. Las puntuaciones de riesgo se calcularon sobre modelos prometedores. Se escogieron umbrales en las puntuaciones de riesgo que maximizaban la sensibilidad/especificidad

del modelo multimarcador.

El área debajo de las curvas características receptor-operador individuales para diez marcadores se muestran en la Tabla 2 (columna etiquetada "AUROC"). Estos marcadores se usaron en combinación con otros biomarcadores para construir modelos de regresión logística para la discriminación de IAI frente a sin IAI, que se muestran en las Figuras 11 y 12. Los parámetros para cada marcador en el modelo se muestran a continuación en la Tabla 3. Distintas combinaciones de biomarcadores tuvieron un rendimiento superior en modelos multimarcador con respecto al rendimiento de modelo individual.

10 **Tabla 2.** AUROC y valores p de biomarcadores individuales asociados con la predicción de infección intraamniótica.

	AUROC	valor p
AFTP	0,829	0,0001
IL6	0,813	0,0000
LBP	0,692	0,0146
MCP1	0,686	0,0270
B2MG	0,632	0,1148
A1AG	0,617	0,2162
TIMP-1	0,615	0,1588
GRO-ct	0,607	0,1959
MIP1b	0,569	0,4142
VCAM-1	0,598	0,2432

15 **Tabla 3.** Análisis de estimaciones con máxima probabilidad.

Parámetro	DF	Estimación	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	Pr > Chi ²
Ordenada	1	7,1935	7,5066	0,9183	0,3379
AFTP	1	0,6788	0,3701	3,3641	0,0666
IL6	1	1,3192	0,5689	5,3769	0,0204
LBP	1	0,1894	0,7334	0,0667	0,7962
A1AG	1	-0,3369	0,2833	1,4139	0,2344
Groa	1	-2,3908	1,1906	4,0321	0,0446

15 Ejemplo 2

El conjunto de datos de desarrollo para biomarcadores de FVC se analizó para evaluar si un punto de corte para las concentraciones de biomarcadores individuales podría usarse para clasificar pacientes como que tienen un riesgo de infección intraamniótica. Las concentraciones de biomarcadores de FVC individuales se expresan como unidades de masa directamente o valores normalizados de estas unidades de masa. Los valores cuantitativos se analizaron para biomarcadores individuales y para combinaciones de biomarcadores. El enfoque de punto de corte permite que el ensayo de IAI de FVC se formatee como un dispositivo de flujo lateral. En un formato de flujo lateral, los niveles de biomarcadores se puntúan cuantitativamente midiendo la intensidad de banda sobre un lector de flujo lateral.

20 Una combinación de ELISA de analito único y matrices de perlas líquidas multiplexadas basadas en la tecnología xMAP™ se usó para identificar los biomarcadores de IAI. Un cohorte de especímenes de flujo vaginal-cervical humano (N=12) que tenía una prevalencia de IAI del 15 % se recogió en el Ensayo de bancos de especímenes de IAI ProteoGenix. El fluido amniótico de estos sujetos se analizó mediante cultivo aerobio, anaerobio y Mycoplasma así como en ensayos internos de PCR de ADNr 16S para establecer el estado de infección intraamniótica. Los datos de ELISA e inmunoensayo xMAP™ del FVC se analizaron usando análisis de regresión logística, así como análisis de componentes de base, para seleccionar los mejores ocho biomarcadores de FVC capaces de discriminar pacientes con IAI de pacientes sin IAI. A partir de estos ocho biomarcadores, los últimos tres se seleccionaron según la presente divulgación.

25 30 35 Los datos a partir de los estudios ELISA se usaron para simular lecturas de flujo lateral. Los puntos de corte se escogieron para maximizar la sensibilidad puesto que el intento es usar el ensayo de IAI de FVC como una ayuda para evaluar el riesgo de IAI. Otros ensayos comúnmente disponibles, tales como glucosa de fluido amniótico, cepa Gram o cultivo podría usarse para confirmar el diagnóstico de IAI. El enfoque de punto de corte permite que los

resultados del ensayo de PG-IAI se informe como un resultado binario tal como riesgo alto o bajo de infección.

El mejor modelo hasta la fecha utiliza concentraciones de masa de solo dos biomarcadores, α -fetoproteína e IL-6. Los especímenes de paciente que no tienen albúmina detectable (6/298) o altamente hemolizada (11/292) se retiraron del conjunto de datos. Basándose en el estándar de referencia de compuestos del cultivo o ADNr 16S, hubo 23 infectados y 258 no infectados en este conjunto de datos.

Los resultados se muestran en las figuras 13 y 14. Las concentraciones de biomarcador se transformaron con log y se calculó la puntuación de Z. Un punto de corte de suma de puntuación Z de 1,0 se usó en este conjunto de datos de ELISA. Se determinó la suma de la puntuación de Z de los biomarcadores, se clasificó y se determinó un punto de corte. La sensibilidad fue del 82 %, la especificidad del 85 %, el PPV del 33 % y el NPV del 98 %. El AUROC fue de 0,86.

Un biomarcador de FVC adicional, se identificó proteína de unión al factor de crecimiento de insulina-1 (IGFBP-1), que sirve como un vigilante para el panel de factor de riesgo de dos biomarcadores. El biomarcador de IGFBP-1 no es diagnóstico de IAI pero si no que excluye una cantidad de resultados de falso positivo de IAI (basándose en el estándar de referencia de compuestos) y mejora significativamente la especificidad del ensayo de factor de riesgo PG-IAI.

La IGFBP-1 se ha usado como biomarcador en flujo vaginal-cervical para detectar la ruptura de la membrana fetal (AmnioSure Test; Medix Biochemica actim™ Prom Test). La concentración de IGFBP-1 es 1000 a 10.000 veces superior en fluido amniótico que en flujo vaginal-cervical. En el cohorte de ProteoGenix, la ausencia de ruptura prematura de la membrana (PROM) se verificó mediante Fem negativo, nitrazina, agrupación y/o ensayos AmnioSure. Tal como se muestra en el gráfico de Kaplan-Meier a continuación, las concentraciones de IGFBP1 de FVC superiores a 3 μ g/ml son acordes con el nacimiento prematuro sin IAI. Los resultados se muestran en la Figura 15.

Los especímenes de paciente que no tienen albúmina detectable (6/298), altamente hemolizada (11/292) o concentraciones de IGFBP1 superiores a 3 μ g/ml (15/281) se retiraron del conjunto de datos. Basándose en el estándar de referencia de compuestos del cultivo y/o ADNr 16S, hubo 23 infectados y 243 no infectados en este conjunto de datos. Las dos concentraciones de biomarcador de diagnóstico se transformaron con log y se calculó la puntuación de Z. Se usó punto de corte de suma de puntuación Z de 1,0. Se determinó la suma de la puntuación de Z de los biomarcadores, se clasificó y se determinó un punto de corte. La sensibilidad fue del 82 %, la especificidad del 89 %, el PPV del 41 % y el NPV del 98 %. El AUROC mejoró de 0,86 a 0,89. 11 de 38 (29 %) de especímenes de pacientes de falso positivo se eliminaron resultando en una mejora de la especificidad del 85 % al 89 % y PPV del 33 % al 41 %. En el cohorte de paciente N=266, un 17 % tienen una puntuación de alto riesgo. Los resultados se muestran en las figuras 16 y 17.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Elisabeth I. Laderman
 Thomas H. Grove

<120> BIOMARCADORES DE INMUNODIAGNÓSTICO MULTIVARIADO EN FLUJO VAGINAL CERVICAL
 PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIÓN INTRAAMNIÓTICA

<130> PTX-0014PR

<140> Aún no asignado
 <141> Con la presente

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Ala Arg Ala Ala Leu Ser Ala Ala Pro Ser Asn Pro Arg Leu Leu
 1 5 10 15

Arg Val Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Ala Gly Arg Arg Ala
 20 25 30

Ala Gly Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr
 35 40 45

Leu Gln Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys Ser
 50 55 60

Pro Gly Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn
 65 70 75 80

Gly Arg Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys Ile
 85 90 95

Ile Glu Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn
 100 105

<210> 2

<211> 92

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Lys Leu Cys Val Thr Val Leu Ser Leu Leu Met Leu Val Ala Ala
 1 5 10 15

Phe Cys Ser Pro Ala Leu Ser Ala Pro Met Gly Ser Asp Pro Pro Thr
 20 25 30

Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ala Arg Lys Leu Pro Arg Asn Phe Val
 35 40 45

Val Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser Ser Leu Cys Ser Gln Pro Ala Val Val
 50 55 60

Phe Gln Thr Lys Arg Ser Lys Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser
 65 70 75 80

Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr Asp Leu Glu Leu Asn
 85 90

<210> 3

<211> 201

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Ala Leu Ser Trp Val Leu Thr Val Leu Ser Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Ala Gln Ile Pro Leu Cys Ala Asn Leu Val Pro Val Pro Ile Thr
 20 25 30

Asn Ala Thr Leu Asp Gln Ile Thr Gly Lys Trp Phe Tyr Ile Ala Ser
 35 40 45

Ala Phe Arg Asn Glu Glu Tyr Asn Lys Ser Val Gln Glu Ile Gln Ala
 50 55 60

Thr Phe Phe Tyr Phe Thr Pro Asn Lys Thr Glu Asp Thr Ile Phe Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Tyr Gln Thr Arg Gln Asp Gln Cys Ile Tyr Asn Thr Thr Tyr
 85 90 95

Leu Asn Val Gln Arg Glu Asn Gly Thr Ile Ser Arg Tyr Val Gly Gly
 100 105 110

Gln Glu His Phe Ala His Leu Leu Ile Leu Arg Asp Thr Lys Thr Tyr
 115 120 125

Met Leu Ala Phe Asp Val Asn Asp Glu Lys Asn Trp Gly Leu Ser Val
 130 135 140

Tyr Ala Asp Lys Pro Glu Thr Thr Lys Glu Gln Leu Gly Glu Phe Tyr
 145 150 155 160

Glu Ala Leu Asp Cys Leu Arg Ile Pro Lys Ser Asp Val Val Tyr Thr
 165 170 175

Asp Trp Lys Lys Asp Lys Cys Glu Pro Leu Glu Lys Gln His Glu Lys
 180 185 190

Glu Arg Lys Gln Glu Glu Gly Glu Ser
 195 200

<210> 4

<211> 609

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Lys Trp Val Glu Ser Ile Phe Leu Ile Phe Leu Leu Asn Phe Thr
 1 5 10 15

Glu Ser Arg Thr Leu His Arg Asn Glu Tyr Gly Ile Ala Ser Ile Leu
 20 25 30

Asp Ser Tyr Gln Cys Thr Ala Glu Ile Ser Leu Ala Asp Leu Ala Thr
 35 40 45

Ile Phe Phe Ala Gln Phe Val Gln Glu Ala Thr Tyr Lys Glu Val Ser
 50 55 60

Lys Met Val Lys Asp Ala Leu Thr Ala Ile Glu Lys Pro Thr Gly Asp
 65 70 75 80

Glu Gln Ser Ser Gly Cys Leu Glu Asn Gln Leu Pro Ala Phe Leu Glu
 85 90 95

Glu Leu Cys His Glu Lys Glu Ile Leu Glu Lys Tyr Gly His Ser Asp
 100 105 110

Cys Cys Ser Gln Ser Glu Glu Gly Arg His Asn Cys Phe Leu Ala His
 115 120 125

Lys Lys Pro Thr Pro Ala Ser Ile Pro Leu Phe Gln Val Pro Glu Pro
 130 135 140

Val Thr Ser Cys Glu Ala Tyr Glu Glu Asp Arg Glu Thr Phe Met Asn
 145 150 155 160

Lys Phe Ile Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Phe Leu Tyr Ala Pro
 165 170 175

Thr Ile Leu Leu Trp Ala Ala Arg Tyr Asp Lys Ile Ile Pro Ser Cys
 180 185 190

Cys Lys Ala Glu Asn Ala Val Glu Cys Phe Gln Thr Lys Ala Ala Thr
 195 200 205

Val Thr Lys Glu Leu Arg Glu Ser Ser Leu Leu Asn Gln His Ala Cys
 210 215 220

Ala Val Met Lys Asn Phe Gly Thr Arg Thr Phe Gln Ala Ile Thr Val
 225 230 235 240

Thr Lys Leu Ser Gln Lys Phe Thr Lys Val Asn Phe Thr Glu Ile Gln
 245 250 255

Lys Leu Val Leu Asp Val Ala His Val His Glu His Cys Cys Arg Gly
 260 265 270

Asp Val Leu Asp Cys Leu Asp Gly Glu Lys Ile Met Ser Tyr Ile
 275 280 285

Cys Ser Gln Gln Asp Thr Leu Ser Asn Lys Ile Thr Glu Cys Cys Lys
 290 295 300

Leu Thr Thr Leu Glu Arg Gly Gln Cys Ile Ile His Ala Glu Asn Asp
 305 310 315 320

Glu Lys Pro Glu Gly Leu Ser Pro Asn Leu Asn Arg Phe Leu Gly Asp
 325 330 335

Arg Asp Phe Asn Gln Phe Ser Ser Gly Glu Lys Asn Ile Phe Leu Ala
 340 345 350

Ser Phe Val His Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Gln Leu Ala Val Ser
 355 360 365

Val Ile Leu Arg Val Ala Lys Gly Tyr Gln Glu Leu Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Phe Gln Thr Glu Asn Pro Leu Glu Cys Gln Asp Lys Gly Glu Glu Glu
 385 390 395 400

Leu Gln Lys Tyr Ile Gln Glu Ser Gln Ala Leu Ala Lys Arg Ser Cys
 405 410 415

Gly Leu Phe Gln Lys Leu Gly Glu Tyr Tyr Leu Gln Asn Ala Phe Leu
 420 425 430

Val Ala Tyr Thr Lys Lys Ala Pro Gln Leu Thr Ser Ser Glu Leu Met
 435 440 445

Ala Ile Thr Arg Lys Met Ala Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Gln Leu
 450 455 460

Ser Glu Asp Lys Leu Leu Ala Cys Gly Glu Gly Ala Ala Asp Ile Ile
 465 470 475 480

Ile Gly His Leu Cys Ile Arg His Glu Met Thr Pro Val Asn Pro Gly
 485 490 495

Val Gly Gln Cys Cys Thr Ser Ser Tyr Ala Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ser Leu Val Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Pro Ala Phe Ser Asp
 515 520 525
 Asp Lys Phe Ile Phe His Lys Asp Leu Cys Gln Ala Gln Gly Val Ala
 530 535 540
 Leu Gln Thr Met Lys Gln Glu Phe Leu Ile Asn Leu Val Lys Gln Lys
 545 550 555 560
 Pro Gln Ile Thr Glu Glu Gln Leu Glu Ala Val Ile Ala Asp Phe Ser
 565 570 575
 Gly Leu Leu Glu Lys Cys Cys Gln Gly Gln Glu Gln Glu Val Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Gln Lys Leu Ile Ser Lys Thr Arg Ala Ala Leu Gly
 595 600 605

Val

<210> 5

<211> 212

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
 20 25 30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
 35 40 45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
 50 55 60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
 85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
 100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
130 135 140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
195 200 205

Leu Arg Gln Met
210

<210> 6

<211> 480

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

Met Gly Ala Leu Ala Arg Ala Leu Pro Ser Ile Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Leu Thr Ser Thr Pro Glu Ala Leu Gly Ala Asn Pro Gly Leu Val Ala
20 25 30

Arg Ile Thr Asp Lys Gly Leu Gln Tyr Ala Ala Gln Glu Gly Leu Leu
35 40 45

Ala Leu Gln Ser Glu Leu Leu Arg Ile Thr Leu Pro Asp Phe Thr Gly
50 55 60

Asp Leu Arg Ile Pro His Val Gly Arg Gly Arg Tyr Glu Phe His Ser
65 70 75 80

Leu Asn Ile His Ser Cys Glu Leu Leu His Ser Ala Leu Arg Pro Val
85 90 95

Pro Gly Gln Gly Leu Ser Leu Ser Ile Ser Asp Ser Ser Ile Arg Val
100 105 110

Gln Gly Arg Trp Lys Val Arg Lys Ser Phe Phe Lys Leu Gln Gly Ser
115 120 125

Phe Asp Val Ser Val Lys Gly Ile Ser Ile Ser Val Asn Leu Leu Leu

130	135	140
Gly Ser Glu Ser Ser Gly Arg Pro Thr Val Thr Ala Ser Ser Cys Ser		
145	150	155
160		
Ser Asp Ile Ala Asp Val Glu Val Asp Met Ser Gly Asp Leu Gly Trp		
165	170	175
Leu Leu Asn Leu Phe His Asn Gln Ile Glu Ser Lys Phe Gln Lys Val		
180	185	190
Leu Glu Ser Arg Ile Cys Glu Met Ile Gln Lys Ser Val Ser Ser Asp		
195	200	205
Leu Gln Pro Tyr Leu Gln Thr Leu Pro Val Thr Thr Glu Ile Asp Ser		
210	215	220
Phe Ala Asp Ile Asp Tyr Ser Leu Val Glu Ala Pro Arg Ala Thr Ala		
225	230	235
240		
Gln Met Leu Glu Val Met Phe Lys Gly Glu Ile Phe His Arg Asn His		
245	250	255
Arg Ser Pro Val Thr Leu Leu Ala Ala Val Met Ser Leu Pro Glu Glu		
260	265	270
His Asn Lys Met Val Tyr Phe Ala Ile Ser Asp Tyr Val Phe Asn Thr		
275	280	285
Ala Ser Leu Val Tyr His Glu Glu Gly Tyr Leu Asn Phe Ser Ile Thr		
290	295	300
Asp Asp Met Ile Pro Pro Asp Ser Asn Ile Arg Leu Thr Thr Lys Ser		
305	310	315
320		
Phe Arg Pro Phe Val Pro Arg Leu Ala Arg Leu Tyr Pro Asn Met Asn		
325	330	335
Leu Glu Leu Gln Gly Ser Val Pro Ser Ala Pro Leu Leu Asn Phe Ser		
340	345	350
Pro Gly Asn Leu Ser Val Asp Pro Tyr Met Glu Ile Asp Ala Phe Val		
355	360	365
Leu Leu Pro Ser Ser Ser Lys Glu Pro Val Phe Arg Leu Ser Val Ala		
370	375	380
Thr Asn Val Ser Ala Thr Leu Thr Phe Asn Thr Ser Lys Ile Thr Gly		
385	390	395
400		
Phe Leu Lys Pro Gly Lys Val Lys Val Glu Leu Lys Glu Ser Lys Val		

405

410

415

Gly Leu Phe Asn Ala Glu Leu Leu Glu Ala Leu Leu Asn Tyr Tyr Ile
420 425 430

Leu Asn Thr Phe Tyr Pro Lys Phe Asn Asp Lys Leu Ala Glu Gly Phe
435 440 445

Pro Leu Pro Leu Leu Lys Arg Val Gln Leu Tyr Asp Leu Gly Leu Gln
450 455 460

Ile His Lys Asp Phe Leu Phe Leu Gly Ala Asn Val Gln Tyr Met Arg
465 470 475 480

<210> 7

<211> 739

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp
 1 5 10 15

Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Phe Lys Ile Glu Thr Thr Pro Glu
 20 25 30

Ser Arg Tyr Leu Ala Gln Ile Gly Asp Ser Val Ser Leu Thr Cys Ser
 35 40 45

Thr Thr Gly Cys Glu Ser Pro Phe Phe Ser Trp Arg Thr Gln Ile Asp
 50 55 60

Ser Pro Leu Asn Gly Lys Val Thr Asn Glu Gly Thr Thr Ser Thr Leu
 65 70 75 80

Thr Met Asn Pro Val Ser Phe Gly Asn Glu His Ser Tyr Leu Cys Thr
 85 90 95

Ala Thr Cys Glu Ser Arg Lys Leu Glu Lys Gly Ile Gln Val Glu Ile
 100 105 110

Tyr Ser Phe Pro Lys Asp Pro Glu Ile His Leu Ser Gly Pro Leu Glu
 115 120 125

Ala Gly Lys Pro Ile Thr Val Lys Cys Ser Val Ala Asp Val Tyr Pro
 130 135 140

Phe Asp Arg Leu Glu Ile Asp Leu Leu Lys Gly Asp His Leu Met Lys
 145 150 155 160

Ser Gln Glu Phe Leu Glu Asp Ala Asp Arg Lys Ser Leu Glu Thr Lys
 165 170 175

Ser Leu Glu Val Thr Phe Thr Pro Val Ile Glu Asp Ile Gly Lys Val
 180 185 190
 Leu Val Cys Arg Ala Lys Leu His Ile Asp Glu Met Asp Ser Val Pro
 195 200 205
 Thr Val Arg Gln Ala Val Lys Glu Leu Gln Val Tyr Ile Ser Pro Lys
 210 215 220
 Asn Thr Val Ile Ser Val Asn Pro Ser Thr Lys Leu Gln Glu Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Val Thr Met Thr Cys Ser Ser Glu Gly Leu Pro Ala Pro Glu Ile
 245 250 255
 Phe Trp Ser Lys Lys Leu Asp Asn Gly Asn Leu Gln His Leu Ser Gly
 260 265 270
 Asn Ala Thr Leu Thr Leu Ile Ala Met Arg Met Glu Asp Ser Gly Ile
 275 280 285
 Tyr Val Cys Glu Gly Val Asn Leu Ile Gly Lys Asn Arg Lys Glu Val
 290 295 300
 Glu Leu Ile Val Gln Glu Lys Pro Phe Thr Val Glu Ile Ser Pro Gly
 305 310 315 320
 Pro Arg Ile Ala Ala Gln Ile Gly Asp Ser Val Met Leu Thr Cys Ser
 325 330 335
 Val Met Gly Cys Glu Ser Pro Ser Phe Ser Trp Arg Thr Gln Ile Asp
 340 345 350
 Ser Pro Leu Ser Gly Lys Val Arg Ser Glu Gly Thr Asn Ser Thr Leu
 355 360 365
 Thr Leu Ser Pro Val Ser Phe Glu Asn Glu His Ser Tyr Leu Cys Thr
 370 375 380
 Val Thr Cys Gly His Lys Lys Leu Glu Lys Gly Ile Gln Val Glu Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Phe Pro Arg Asp Pro Glu Ile Glu Met Ser Gly Gly Leu Val
 405 410 415
 Asn Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Val Pro Ser Val Tyr Pro
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Glu Ile Glu Leu Leu Lys Gly Glu Thr Ile Leu Glu
 435 440 445

Asn Ile Glu Phe Leu Glu Asp Thr Asp Met Lys Ser Leu Glu Asn Lys
 450 455 460
 Ser Leu Glu Met Thr Phe Ile Pro Thr Ile Glu Asp Thr Gly Lys Ala
 465 470 475 480
 Leu Val Cys Gln Ala Lys Leu His Ile Asp Asp Met Glu Phe Glu Pro
 485 490 495
 Lys Gln Arg Gln Ser Thr Gln Thr Leu Tyr Val Asn Val Ala Pro Arg
 500 505 510
 Asp Thr Thr Val Leu Val Ser Pro Ser Ser Ile Leu Glu Glu Gly Ser
 515 520 525
 Ser Val Asn Met Thr Cys Leu Ser Gln Gly Phe Pro Ala Pro Lys Ile
 530 535 540
 Leu Trp Ser Arg Gln Leu Pro Asn Gly Glu Leu Gln Pro Leu Ser Glu
 545 550 555 560
 Asn Ala Thr Leu Thr Leu Ile Ser Thr Lys Met Glu Asp Ser Gly Val
 565 570 575
 Tyr Leu Cys Glu Gly Ile Asn Gln Ala Gly Arg Ser Arg Lys Glu Val
 580 585 590
 Glu Leu Ile Ile Gln Val Thr Pro Lys Asp Ile Lys Leu Thr Ala Phe
 595 600 605
 Pro Ser Glu Ser Val Lys Glu Gly Asp Thr Val Ile Ile Ser Cys Thr
 610 615 620
 Cys Gly Asn Val Pro Glu Thr Trp Ile Ile Leu Lys Lys Lys Ala Glu
 625 630 635 640
 Thr Gly Asp Thr Val Leu Lys Ser Ile Asp Gly Ala Tyr Thr Ile Arg
 645 650 655
 Lys Ala Gln Leu Lys Asp Ala Gly Val Tyr Glu Cys Glu Ser Lys Asn
 660 665 670
 Lys Val Gly Ser Gln Leu Arg Ser Leu Thr Leu Asp Val Gln Gly Arg
 675 680 685
 Glu Asn Asn Lys Asp Tyr Phe Ser Pro Glu Leu Leu Val Leu Tyr Phe
 690 695 700
 Ala Ser Ser Leu Ile Ile Pro Ala Ile Gly Met Ile Ile Tyr Phe Ala
 705 710 715 720

Arg Lys Ala Asn Met Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Val Glu Ala Gln Lys
 725 730 735

Ser Lys Val

<210> 8

<211> 99

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ile Ala Ala Thr
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val
 20 25 30

Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu
 35 40 45

Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val
 50 55 60

Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80

Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr
 85 90 95

10 Pro Lys Thr

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
 20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
 35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
 50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

<210> 10

<211> 207

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro Pro His Pro Gln
 20 25 30

Thr Ala Phe Cys Asn Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala Lys Phe Val Gly
 35 40 45

Thr Pro Glu Val Asn Gln Thr Thr Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Ile Lys
 50 55 60

Met Thr Lys Met Tyr Lys Gly Phe Gln Ala Leu Gly Asp Ala Ala Asp
 65 70 75 80

Ile Arg Phe Val Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val Cys Gly Tyr Phe
 85 90 95

His Arg Ser His Asn Arg Ser Glu Glu Phe Leu Ile Ala Gly Lys Leu
 100 105 110

Gln Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe Val Ala Pro Trp
 115 120 125

Asn Ser Leu Ser Leu Ala Gln Arg Arg Gly Phe Thr Lys Thr Tyr Thr
 130 135 140

Val Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Leu Ser Ile Pro Cys
 145 150 155 160

Lys Leu Gln Ser Gly Thr His Cys Leu Trp Thr Asp Gln Leu Leu Gln
 165 170 175

Gly Ser Glu Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala Cys Leu Pro Arg
 180 185 190

Glu Pro Gly Leu Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Ser Gln Ile Ala
 195 200 205

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de inflamación o infección intraamnióticas en una muestra obtenida a partir de un sujeto mamífero de sexo femenino en estado de embarazo que comprende:

- 5 (a) medir en una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de dicho sujeto el nivel de alfa-fetoproteína (AFP) e interleucina-6 (IL-6) en relación con los niveles correspondientes de dichas proteínas en un flujo vaginal-cervical normal o un flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de inflamación o infección intraamnióticas; y
 10 (b) detectar inflamación o infección intraamnióticas en dicha muestra si se determina que dichos niveles de cada una de dichas proteínas en dicha muestra muestran una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de cada una de dichas proteínas en dicho flujo vaginal-cervical normal, o se determina que no muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de cada una de dichas proteínas en dicho flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de inflamación o infección intraamnióticas.

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el sujeto es un paciente humano.

20 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho nivel se determina mediante métodos que comprenden el uso de un inmunoensayo, una matriz de proteínas, un ensayo inmunocromatográfico, espectrometría de masas o combinaciones de los mismos.

25 4. El método de la reivindicación 3 en el que dicho nivel se determina usando un ensayo inmunocromatográfico que emplea un dispositivo de flujo lateral, en el que opcionalmente el dispositivo de flujo lateral es un ensayo de tira inmunocromatográfica (ICS).

5 5. El método de la reivindicación 3, en el que dicho inmunoensayo emplea anticuerpos y reactivos para la detección de IL-6 y AFP, en el que opcionalmente los anticuerpos y reactivos comprenden un anticuerpo de captura y un anticuerpo detector.

30 6. El método de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo de captura y el anticuerpo detector son:

- 35 (a) anticuerpos monoclonales;
 (b) anticuerpos policlonales; o
 (c) o bien anticuerpos monoclonales o policlonales.

35 7. El método de la reivindicación 6, en el que los anticuerpos comprenden anticuerpos monoclonales que tienen una especificidad de unión de IL-6 y AFP y en donde el método comprende además el uso de una inmunoglobulina de anti-anticuerpos.

40 8. El método de la reivindicación 7, en el que los anticuerpos monoclonales y la inmunoglobulina de anti-anticuerpos se proporcionan en una cantidad de:

- 45 (a) de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 gramos; o
 (b) de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 gramo.

45 9. El método de la reivindicación 7, en el que la inmunoglobulina de anti-anticuerpos se selecciona del grupo que consiste en una inmunoglobulina policlonal, proteína A y proteína G o fragmentos funcionales de las mismas.

50 10. El método de la reivindicación 9, en el que la inmunoglobulina de anti-anticuerpos está marcada.

50 11. El método de la reivindicación 5, que comprende además el uso de:

- 55 (a) agentes para reducir la interferencia de fondo en un ensayo o agentes para aumentar la señal; o
 (b) software y algoritmos para combinar e interpolar valores de marcador para producir una predicción del resultado clínico de interés.

12. El método de la reivindicación 5, que comprende además el uso de un aparato para realizar un ensayo.

60 13. Un método para determinar si los signos y síntomas indican inflamación o infección intraamnióticas, que comprende

- 65 (a) medir en una muestra de flujo vaginal-cervical obtenido a partir de un sujeto mamífero de sexo femenino en estado de embarazo los niveles de interleucina-6 (IL-6) y alfa-fetoproteína (AFP) en relación con los niveles correspondientes de dichas proteínas en un flujo vaginal-cervical normal o un flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de inflamación o infección intraamnióticas; y
 (b) diagnosticar a dicho sujeto inflamación o infección intraamnióticas si cada uno de dichos niveles de IL-6 y

AFP en dicha muestra se determina que muestra una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de IL-6 y AFP en dicho flujo vaginal-cervical normal o se determina que no muestran una diferencia estadísticamente significativa en relación con los niveles correspondientes de IL-6 y AFP en dicho flujo vaginal-cervical conocido por ser indicativo de inflamación o infección intraamnióticas.

- 5 14. El método de la reivindicación 13, en el que los signos y síntomas comprenden fiebre materna ($\geq 37,8$ °C), leucocitosis materna ($>15.000 /mm^3$), taquicardia materna y/o fetal, sensibilidad uterina y/o fluido amniótico fétido.
- 10 15. Un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico que comprende tiras de cromatografía para la detección de interleucina-6 (IL-6) y alfa-fetoproteína (AFP) en el que la tira o las tiras de cromatografía comprende(n) anticuerpos de IL-6 y AFP, en donde opcionalmente el dispositivo de ensayo inmunocromatográfico es un dispositivo de flujo lateral.

Figura 1

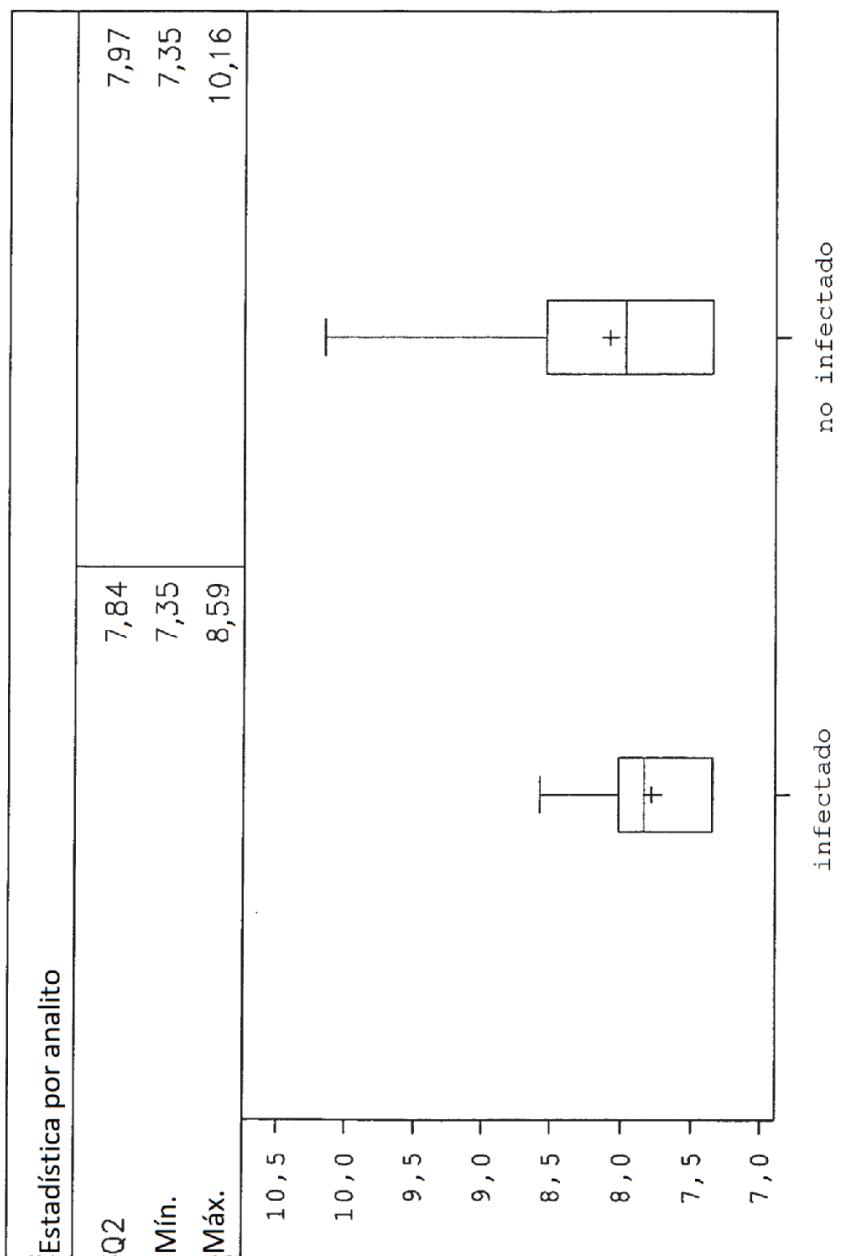


Figura 2

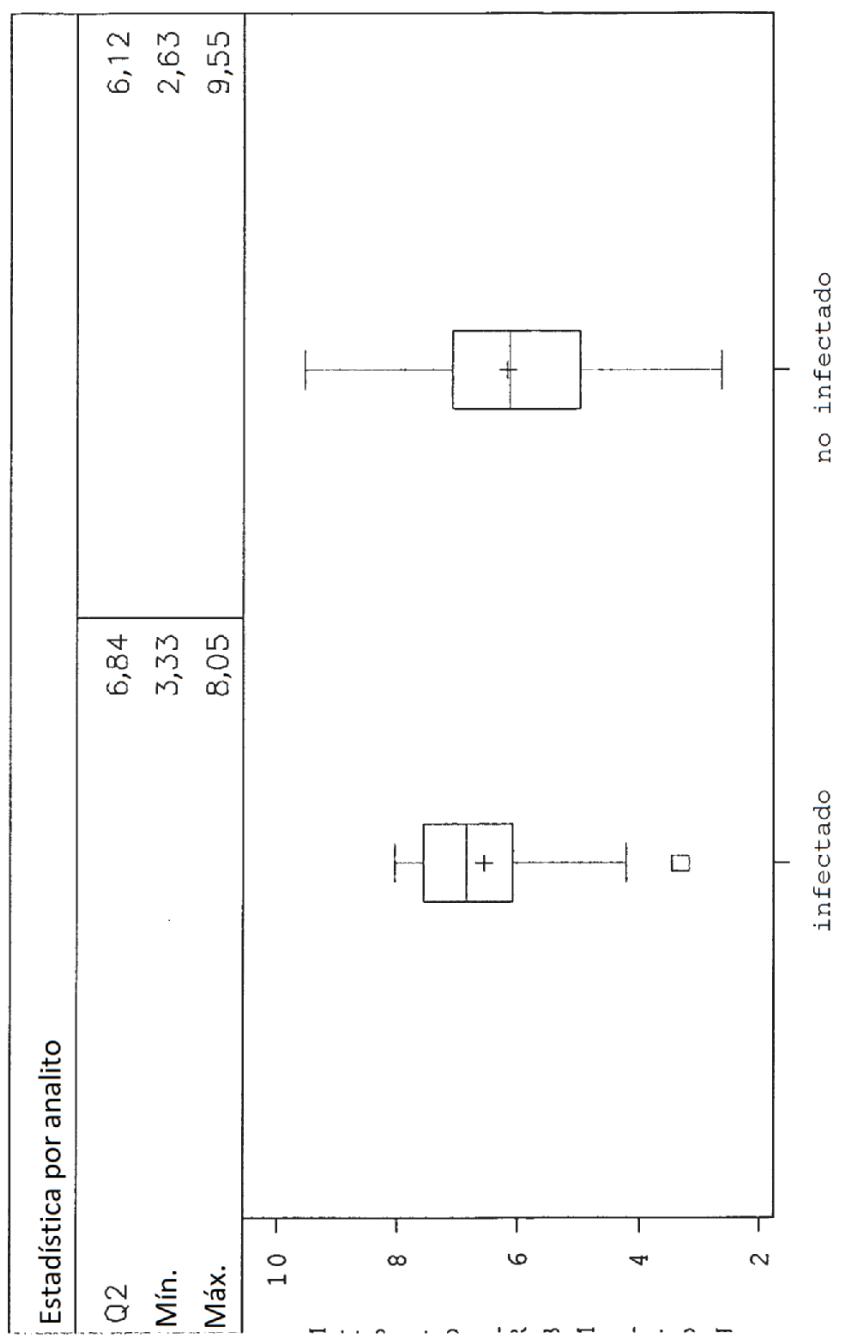


Figura 3

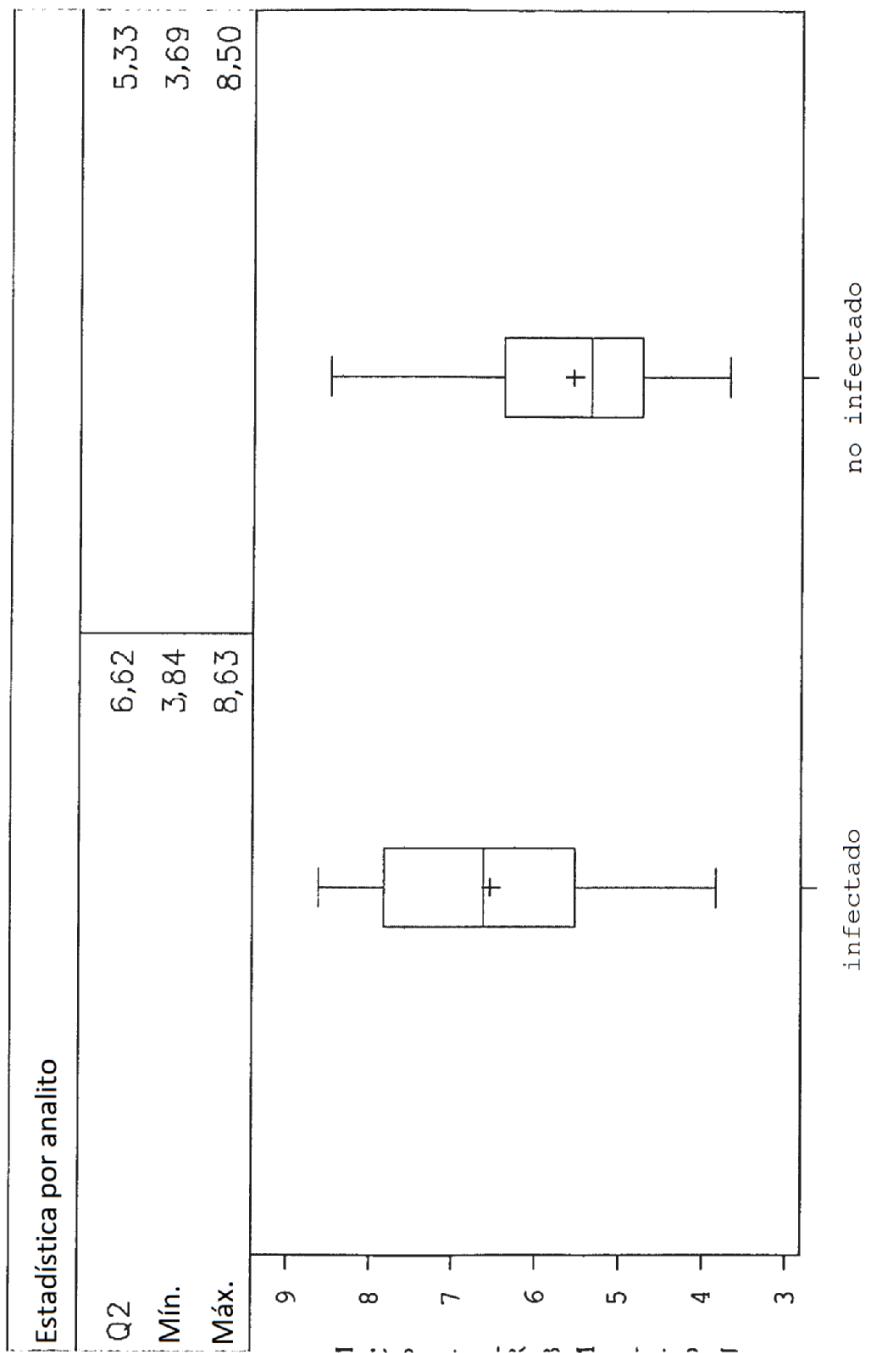


Figura 4

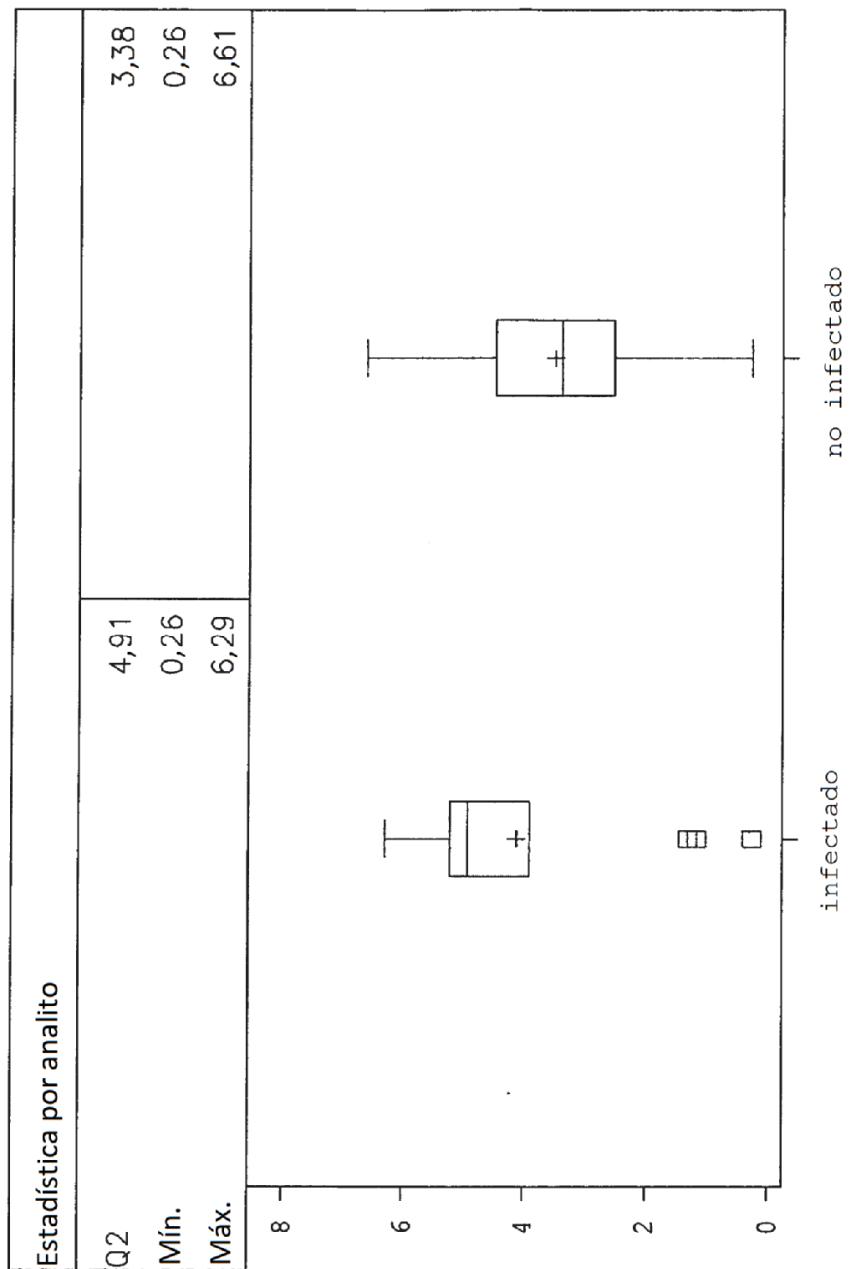


Figura 5

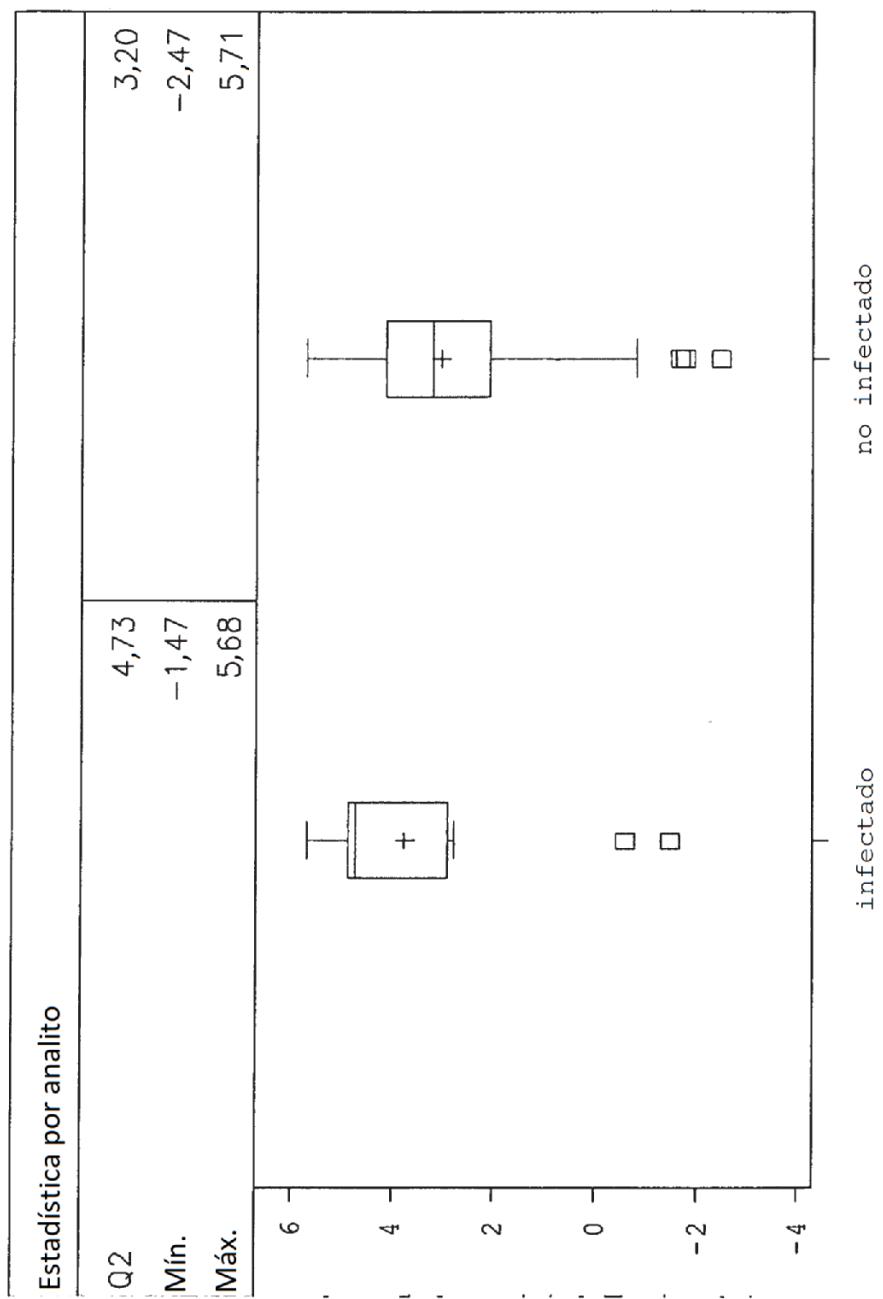


Figura 6

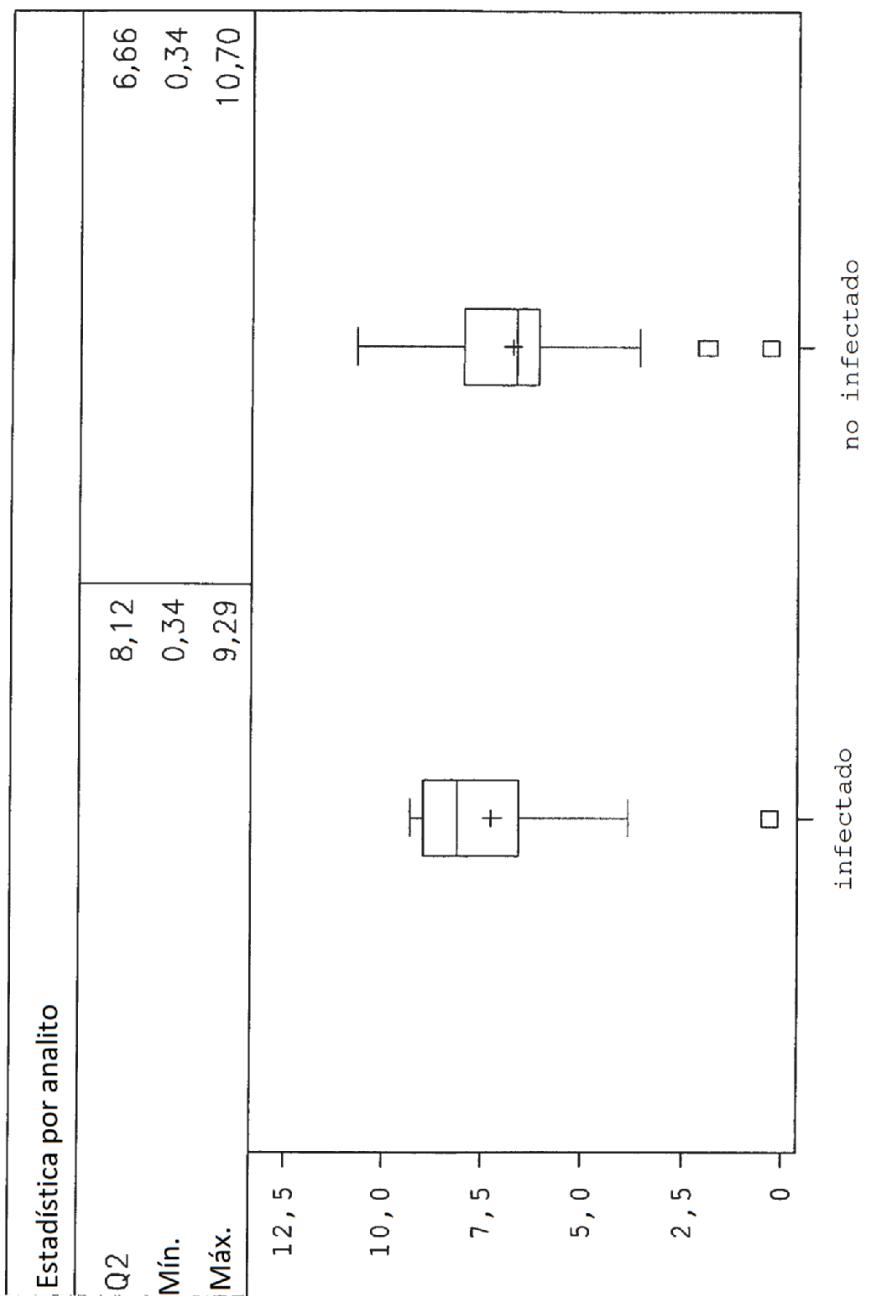


Figura 7

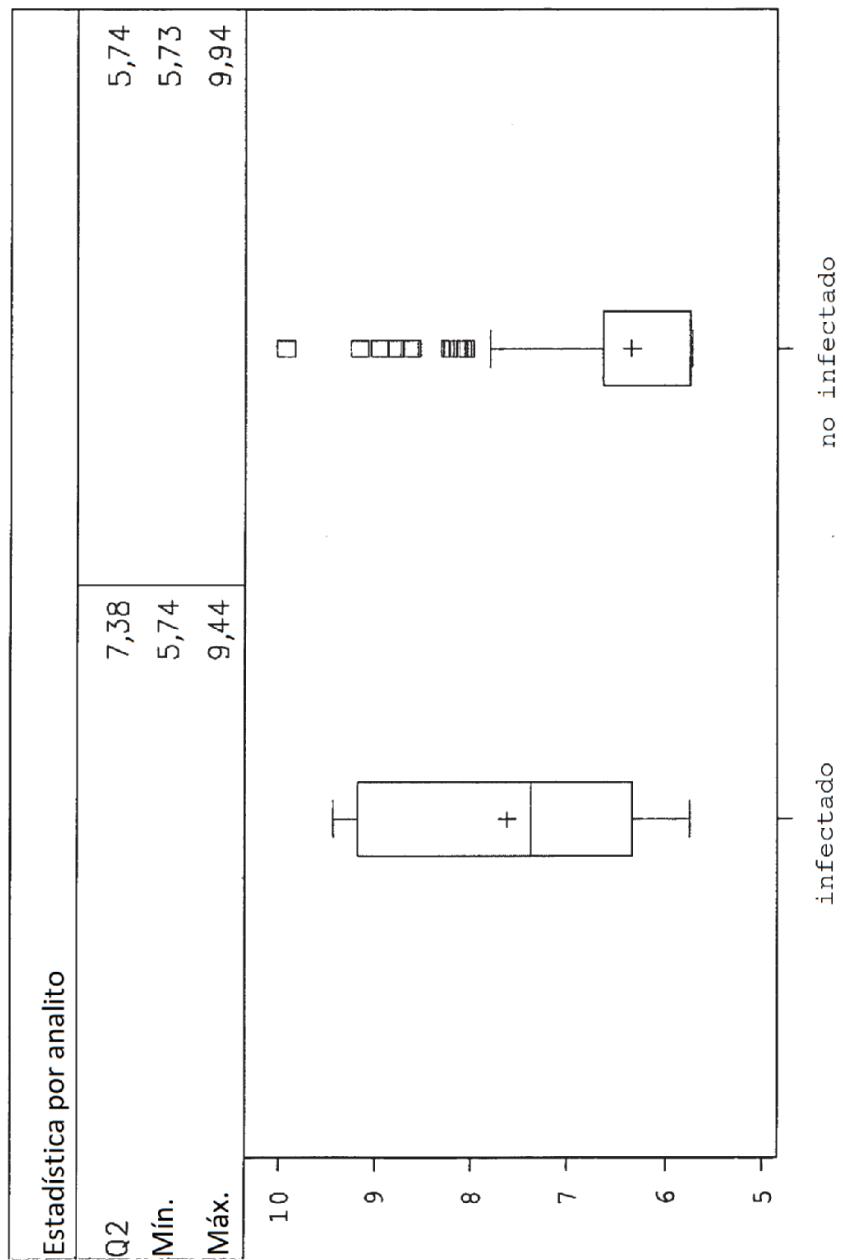


Figura 8

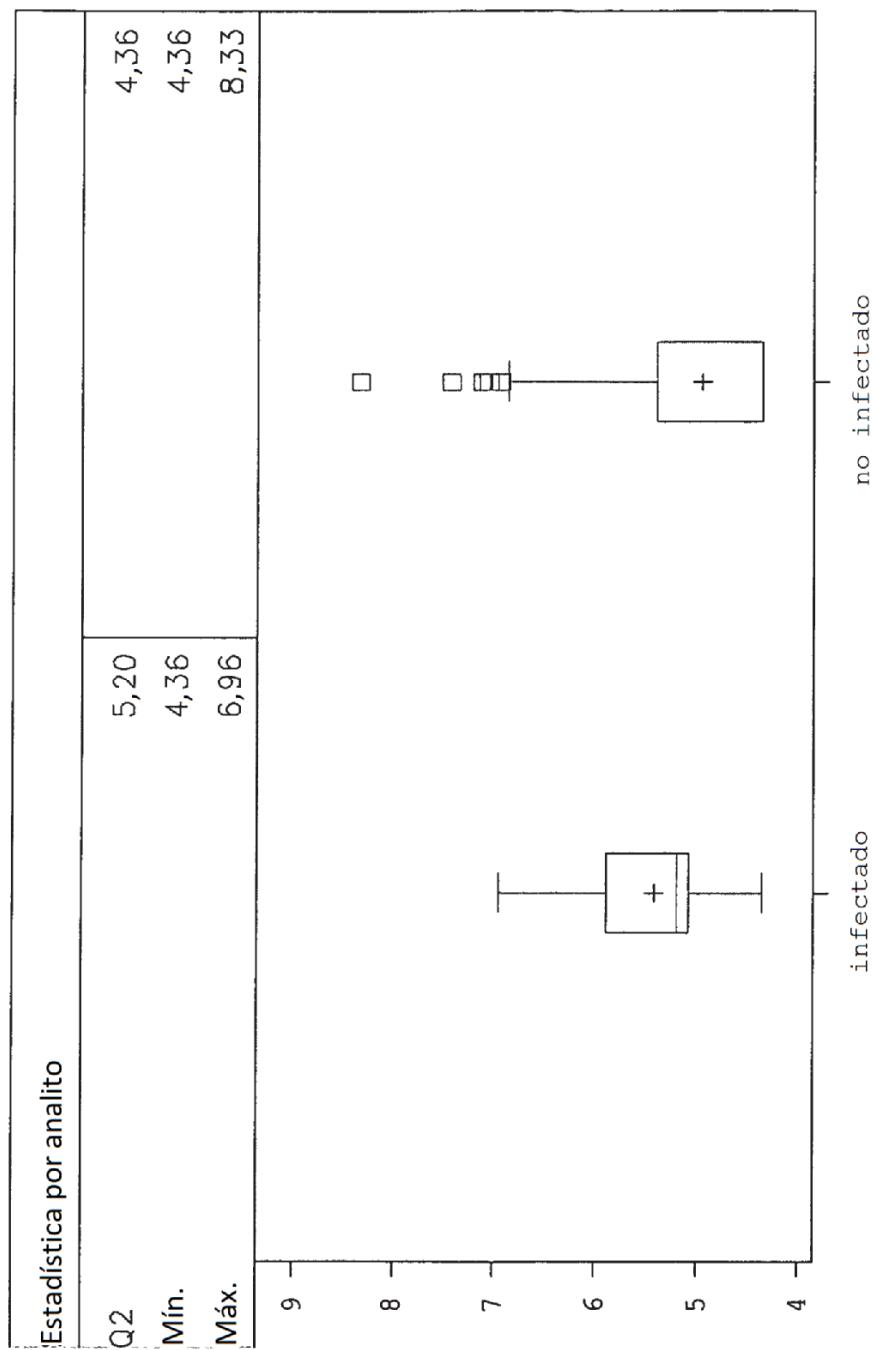


Figura 9

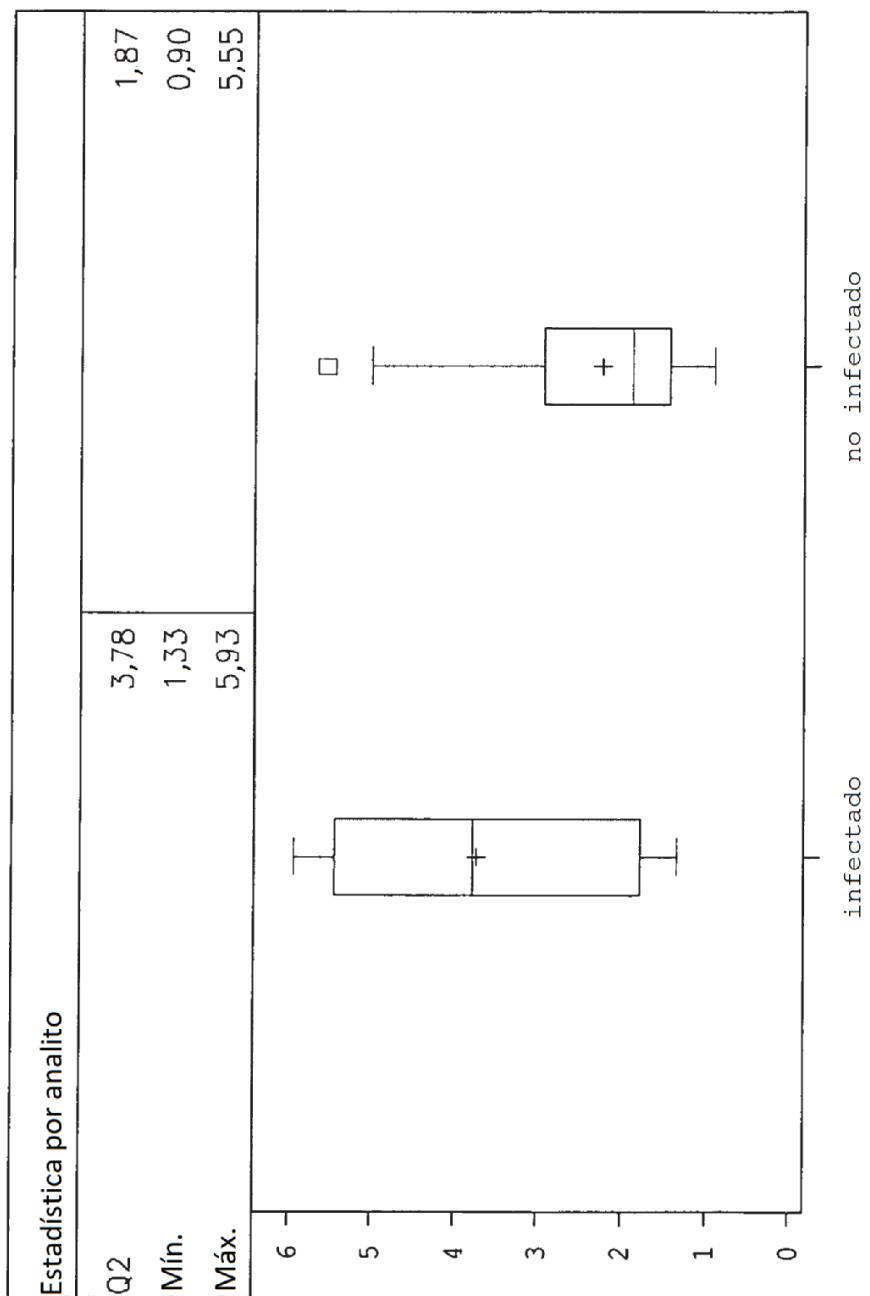


Figura 10

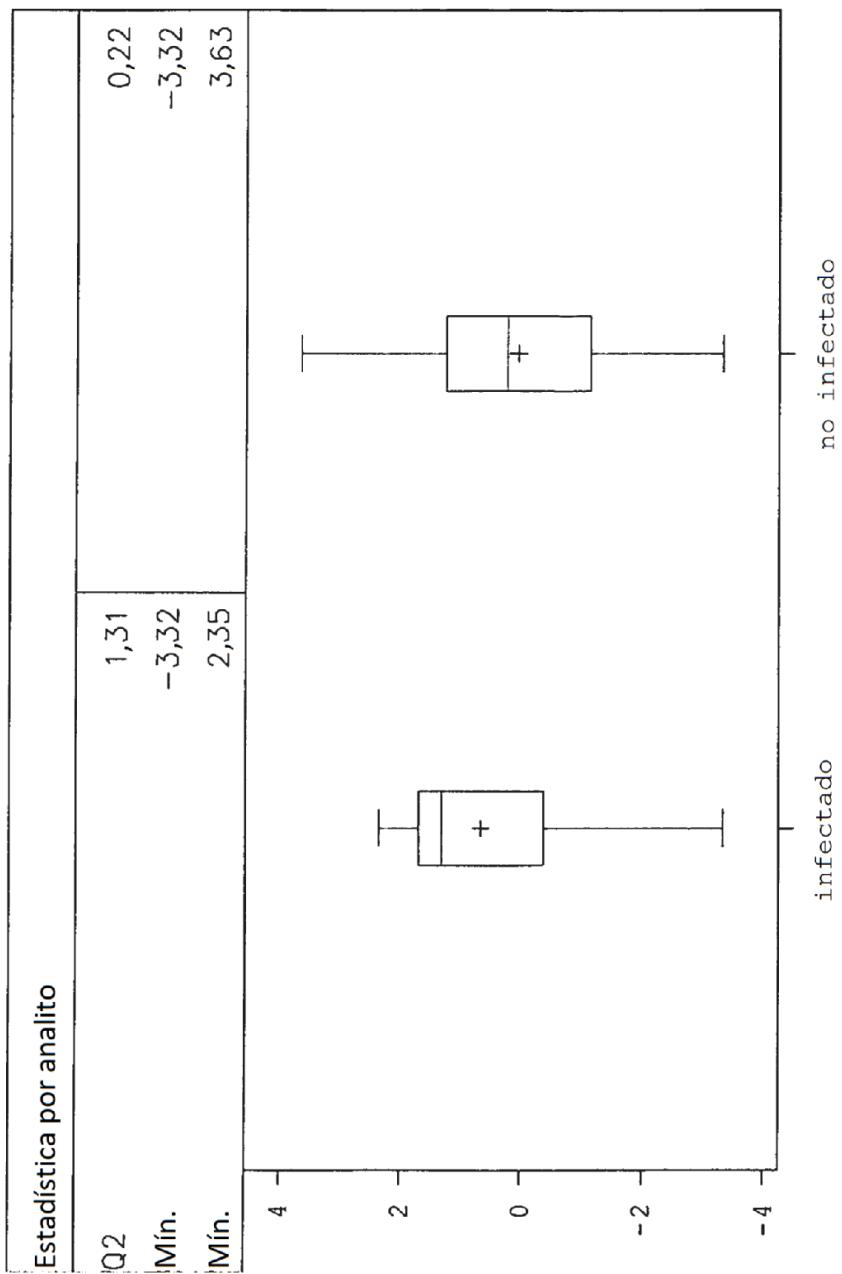


Figura 11

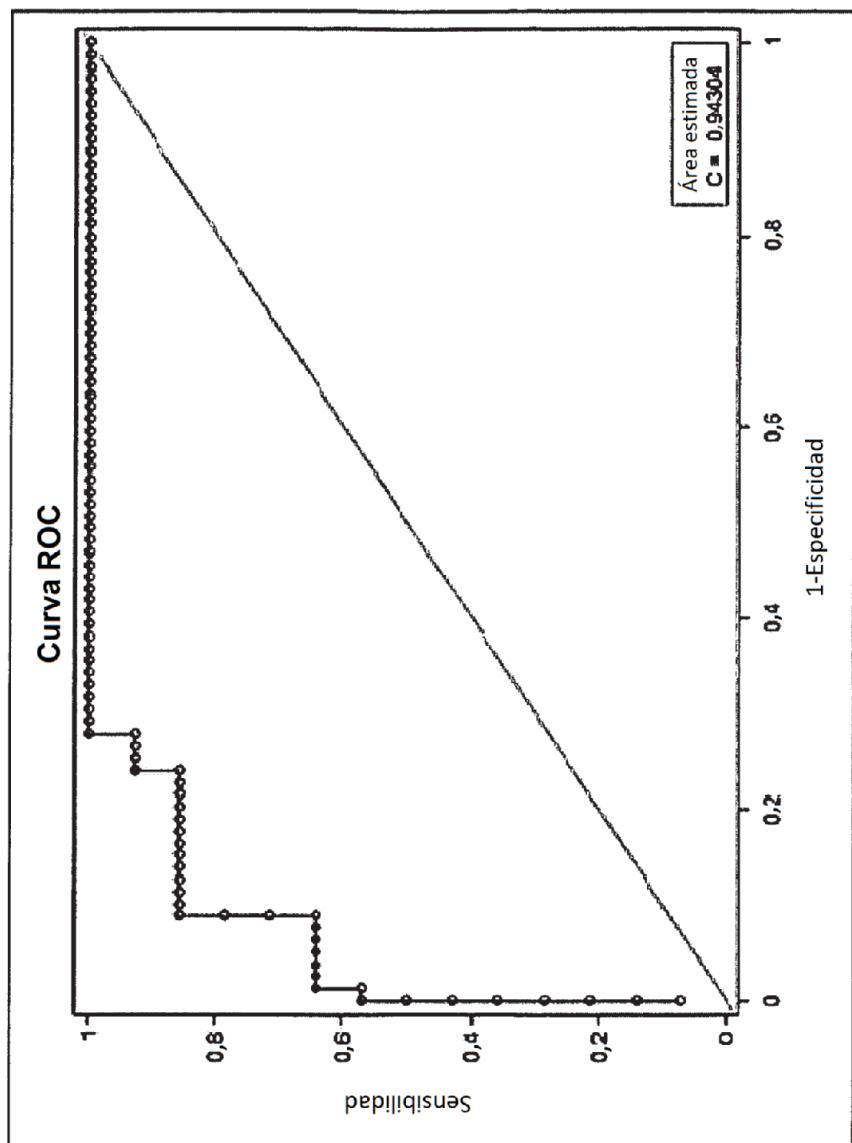


Figura 12

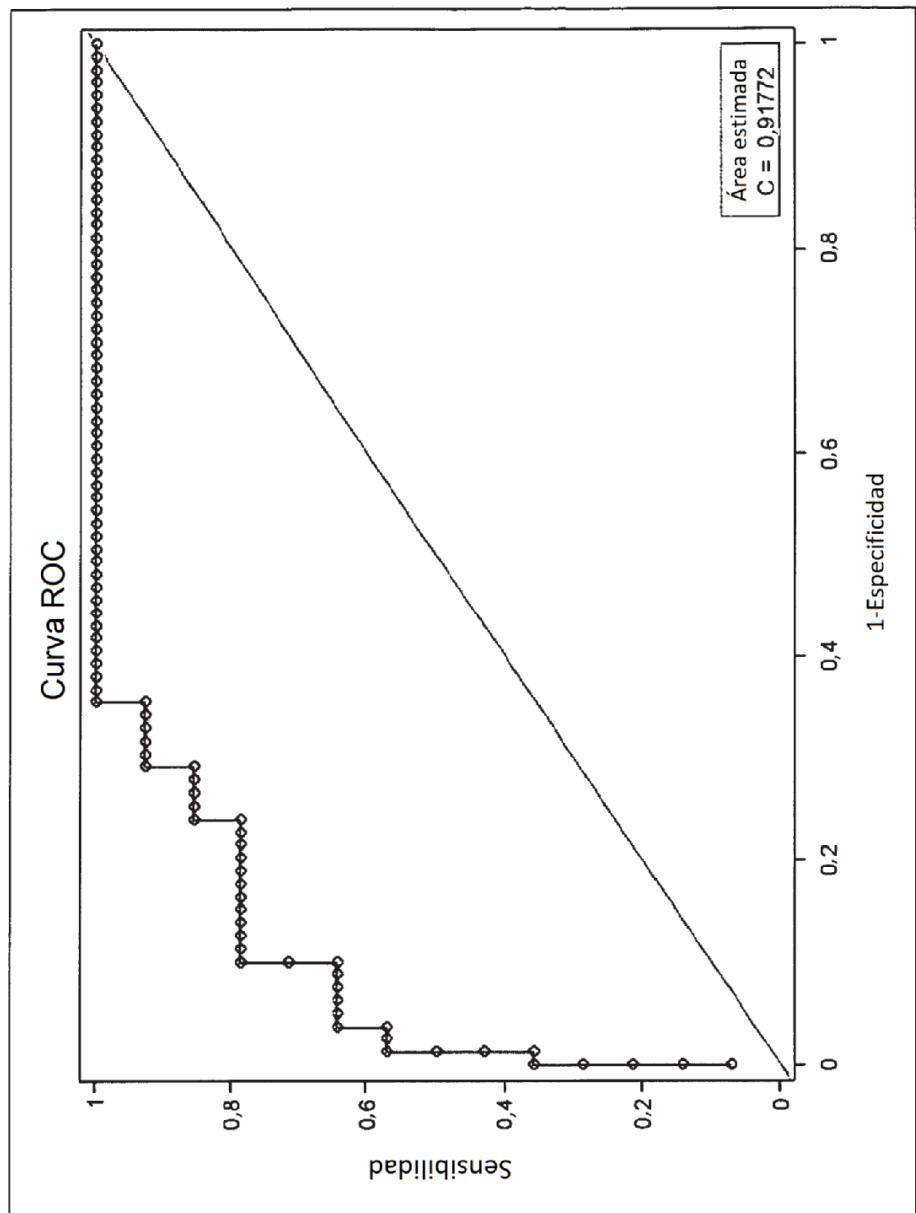


Figura 13

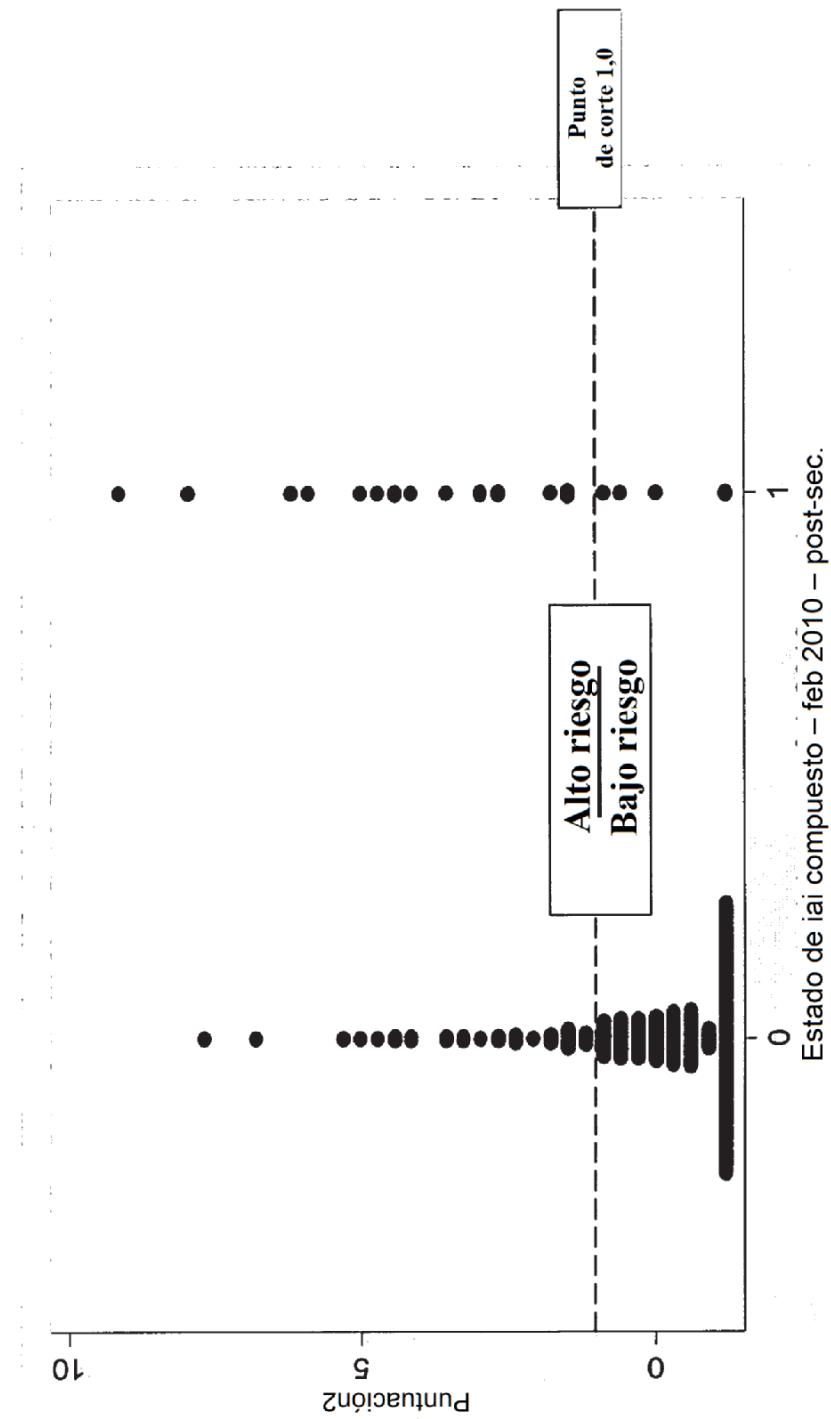


Figura 14

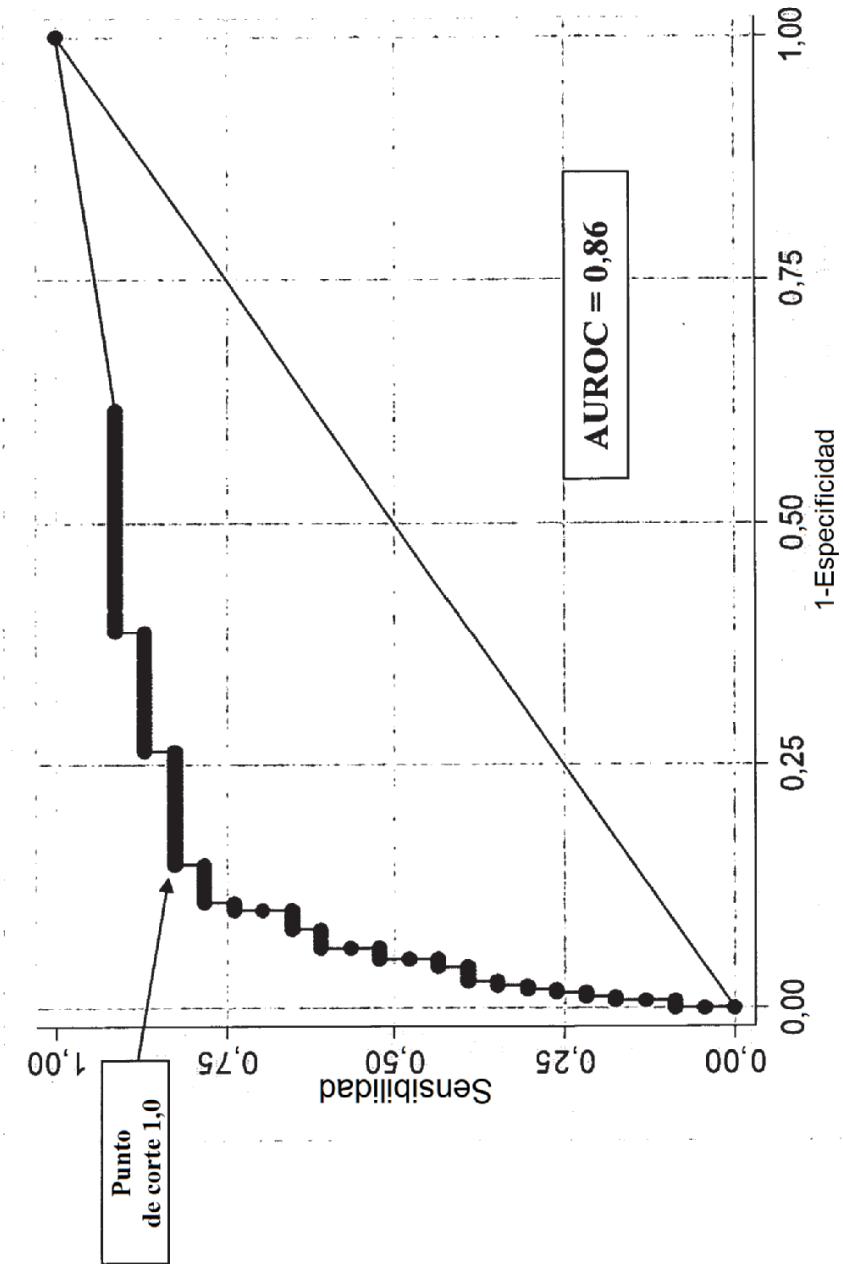


Figura 15

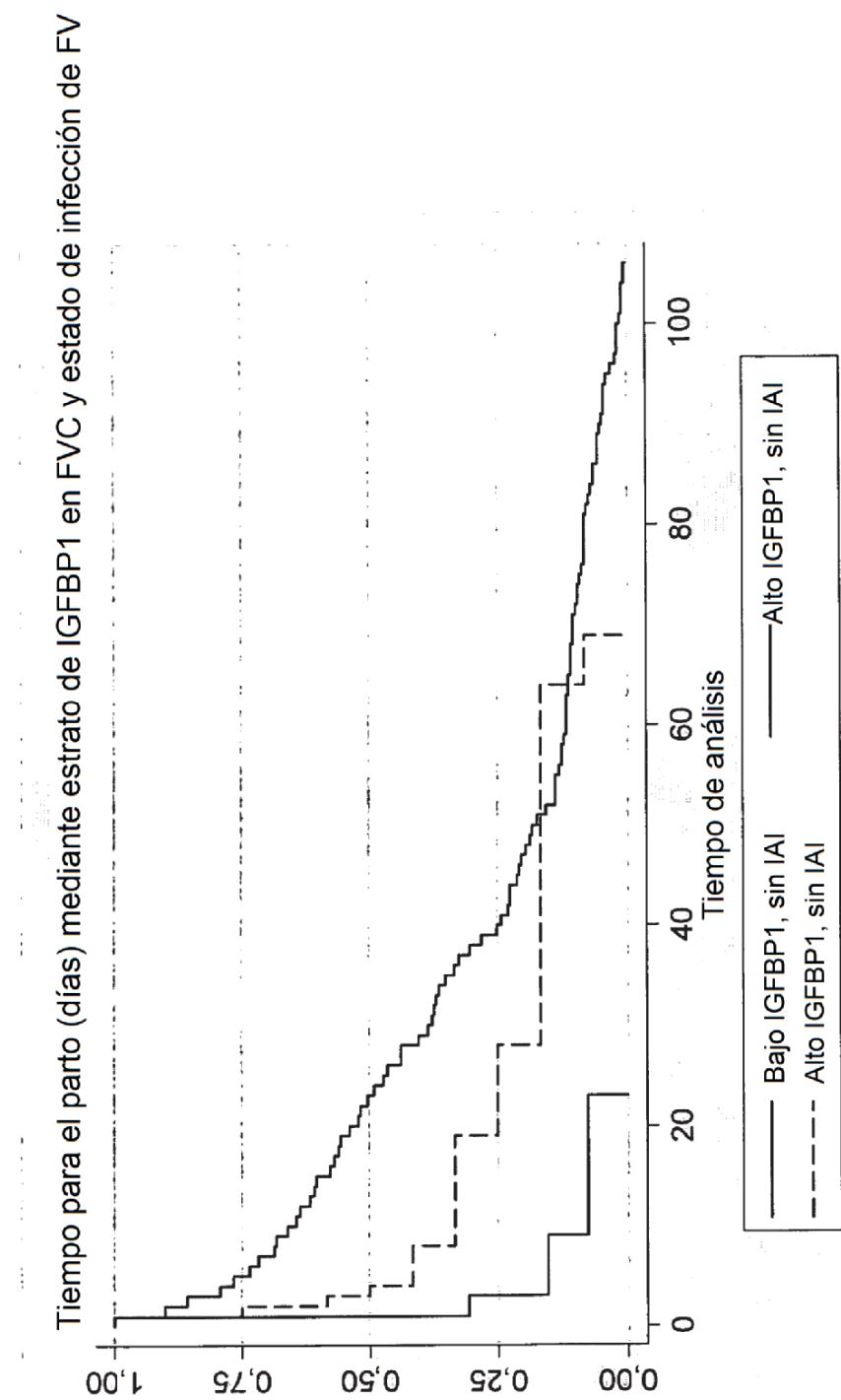


Figura 16

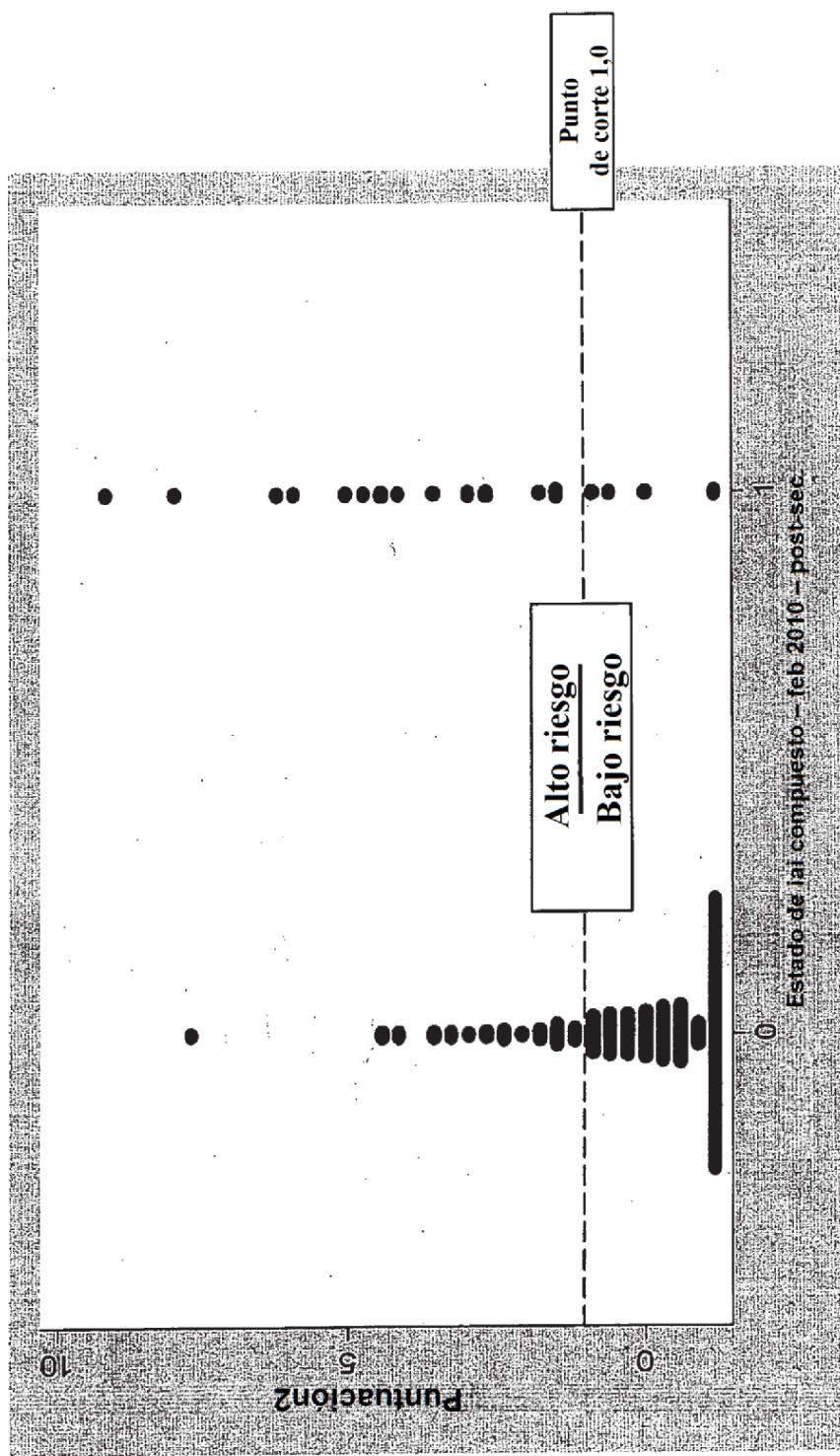


Figura 17

