

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 842 283**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

A61B 10/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2015 PCT/US2015/028881**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15168615**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2015 E 15786663 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020 EP 3137908**

54 Título: **Métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de la meningitis**

30 Prioridad:

02.05.2014 US 201461988025 P

13.02.2015 US 201562116213 P

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

13.07.2021

73 Titular/es:

UAB RESEARCH FOUNDATION (100.0%)

701 S. 20th Street, Suite 1120G

Birmingham, Alabama 35294-0107, US

72 Inventor/es:

BARNUM, SCOTT R.;

RAMOS, THERESA N. y

JOHNSTON, JAMES M.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 842 283 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

Métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de la meningitis

Antecedentes de la invención

La meningitis bacteriana sigue siendo una causa principal de morbilidad y mortalidad, con una alta incidencia de deterioro neurológico residual. El diagnóstico precoz y el inicio inmediato de un tratamiento antimicrobiano adecuado son fundamentales para la supervivencia de los pacientes con meningitis bacteriana. Sin embargo, establecer el diagnóstico de meningitis bacteriana representa una tarea difícil en la mayoría de los casos, ya que los signos clínicos de meningitis aguda son inespecíficos y exámenes de laboratorio del líquido cefalorraquídeo (CSF) a menudo no diferencian con precisión entre meningitis bacteriana y aséptica. La diferenciación precisa entre meningitis bacteriana y aséptica (por ejemplo, viral) es difícil, ya que ambas son enfermedades inflamatorias que provocan respuestas de defensa del huésped y síntomas clínicos similares. El diagnóstico diferencial se puede realizar mediante la identificación positiva de las bacterias del líquido cefalorraquídeo del individuo afectado. Desafortunadamente, puede llevar varios días cultivar e identificar las bacterias y el 25 % de las veces los resultados del cultivo son negativos o equívocos a pesar de que los pacientes tienen meningitis bacteriana. Tasas de error similares o mayores afectan a casi todos los parámetros de laboratorio usados con fines de diagnóstico.

Debido a los efectos beneficiosos de la terapia temprana en la meningitis bacteriana, los antibióticos se inician a menudo antes de que se establezca el diagnóstico etiológico. Como consecuencia, un elevado número de pacientes con meningitis aséptica reciben un tratamiento antibiótico innecesario, lo que conduce a una hospitalización innecesaria y/o prolongada, una mayor carga financiera para el sistema de salud y la exposición del paciente a infecciones y trastornos nosocomiales, así como a otros peligros asociados con la hospitalización.

Pocos parámetros de laboratorio en el líquido cefalorraquídeo determinan la meningitis bacteriana con absoluta certeza, tales como cultivo de líquido cefalorraquídeo positivo y tinción de Gram. Aunque son muy específicos, estos parámetros muestran sensibilidades muy bajas y, por lo tanto, no son útiles para descartar una infección bacteriana. Además del análisis microbiológico, los parámetros inespecíficos en el líquido cefalorraquídeo se usan comúnmente para el diagnóstico diferencial de meningitis bacteriana frente a meningitis aséptica, tal como el recuento total y diferencial de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo, las concentraciones de glucosa y proteína en el líquido cefalorraquídeo, la proporción CSF/glucosa sérica, niveles de líquido cefalorraquídeo lactato y proteína C reactiva. Sin embargo, el valor diagnóstico de estos parámetros sigue siendo controvertido, ya que su intervalo de distribución se superpone ampliamente en el líquido cefalorraquídeo aséptico y bacteriano. Las pruebas actuales para diagnosticar la meningitis bacteriana tardan horas o días en completarse y tienen tasas significativas de falsos positivos. Se puede emplear la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero solo si se dispone de equipo especializado y personal de laboratorio capacitado, y el agente causal se encuentra en cantidades significativas en el líquido cefalorraquídeo. El ingreso hospitalario de pacientes con meningitis aséptica es innecesario, agrega una carga financiera significativa al sistema de atención médica (estimado en \$ 1-2 mil millones/año) y aumenta el riesgo de infecciones peligrosas adquiridas en el hospital. Existe una necesidad crítica de un ensayo rápido y económico que pueda distinguir entre meningitis bacteriana y meningitis aséptica.

Woehrl et al. (J. Clin. Invest. 2011; 121 (10): 3943-3953) observaron un aumento de los niveles de C5 del complemento en el CSF de pacientes con meningitis bacteriana en comparación con controles sanos, y una correlación con los resultados de la enfermedad. Mook- Kanamori et al. (J. Infect. 2014; 68(6):542-547) observaron niveles elevados en CSF del complemento C5a y sC5b-9 en pacientes con meningitis bacteriana en comparación con los controles. Halawa et al. (Acta Neurol. Scand. 1989;80:130-135) observaron que en pacientes con meningitis aséptica los niveles en CSF del complemento C9 están aumentados en comparación con los pacientes con MS o dolores de cabeza por tensión. Lundberg et al. (J Neurosurg 1999, 90:101-108) observaron el complemento C9 activado en catéteres ventriculares temporales y derivaciones ventriculoperitoneales extraídas de los pacientes.

El documento US5778895 describe la relevancia diagnóstica de detectar los niveles de factores C1 y factor B (FB) del complemento en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningitis aséptica o bacteriana.

Carolina Gonza Lez-Rubio et al. (Archives of Neurology vol.58 no.11 2001: 1923-1928) analiza la deficiencia del factor I del complemento asociada con meningitis recurrente que coincide con la menstruación.

F. Haerynck et al. (Revue De Medicine Interne vol.30 2009: 15) analiza la deficiencia del factor B del complemento asociada con la meningitis recurrente.

Marc Tebruegge and Nigel Curtis (Clinical Microbiology Reviews vol.21 No.3 2008: 519-537) analizan la epidemiología, etiología, patogénesis y diagnóstico de meningitis bacteriana recurrente. La presente invención supera las deficiencias anteriores de la técnica.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método *ex vivo* de identificación de uno cualquiera de los siguientes escenarios seleccionados del grupo que comprende: (i) diferenciar la meningitis ya sea como meningitis

- bacteriana o meningitis aséptica en un sujeto que lo necesite; y (ii) diferenciar una infección por meningitis bacteriana asociada con una derivación permanente y/o un dispositivo extraventricular en un sujeto que lo necesite; el método comprende medir la cantidad de: complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del sujeto: a) en el que una cantidad de MAC del complemento medida que es mayor que una cantidad umbral de MAC del complemento identifica el escenario como se define en las partes (i) a (ii); o b) comparar la cantidad de MAC del complemento medida en una muestra de control, en el que una cantidad de MAC del complemento medida en la muestra obtenida del sujeto que es mayor que una cantidad de MAC del complemento medida en la muestra de control identifica la meningitis bacteriana en el escenario como definido en las partes (i) a (ii). En un segundo aspecto, la invención proporciona un método *ex vivo* de orientación de un tratamiento para una cualquiera de los siguientes escenarios seleccionados del grupo que comprende: (i) meningitis bacteriana en un sujeto que lo necesite; y (ii) una infección por meningitis bacteriana asociada con una derivación permanente y/o un dispositivo extraventricular en un sujeto que lo necesite; comprendiendo el método a) medir la cantidad de MAC del complemento en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del sujeto antes de la administración de un tratamiento; b) medir la cantidad de MAC del complemento en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del sujeto en uno o más puntos de tiempo después de dicho tratamiento; c) orientar el tratamiento del sujeto para una cualquiera de los escenarios (i) a (ii) usando la (s) medición (es) de (b) de modo que un aumento o ningún cambio en la (s) cantidad (es) medida (s) en (b) en relación con la (s) cantidad (es) medida (s) en (a) conduce a una mejora posterior del tratamiento, y una disminución en la (s) cantidad (es) medida (s) en (b) en relación con la (s) cantidad (es) medida (s) en (a) no conduce a ningún cambio o una posterior reducción del tratamiento.
- En un tercer aspecto, la invención proporciona un método *ex vivo* de identificación de un régimen de tratamiento para un sujeto con meningitis bacteriana diferenciando una infección ya sea como meningitis bacteriana o meningitis aséptica, que comprende: a) medir la cantidad de MAC del complemento en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del sujeto; b) comparar la cantidad de MAC del complemento medida en (a) con la cantidad de MAC del complemento medida en una muestra de control, en el que una cantidad de MAC del complemento medida en (a) es mayor que la cantidad de MAC del complemento medida en la muestra de control identifica la meningitis como meningitis bacteriana, identificando un régimen de tratamiento de hospitalización y terapia con antibióticos; y en el que una cantidad de MAC del complemento que es menor o igual que la cantidad de MAC del complemento en la muestra de control identifica meningitis aséptica, identificando un régimen de tratamiento sin hospitalización ni terapia con antibióticos.
- En una realización del primer, segundo y tercer aspecto, la cantidad de complemento C9, factor B (FB) del complemento, complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8 y/o complemento C3 en un líquido cefalorraquídeo (CSF) también es medido.
- En una realización del primer, segundo y tercer aspecto, solo se mide la cantidad de un factor de complemento en la muestra de CSF.
- En una realización del primer, segundo y tercer aspecto, solo se mide la cantidad de dos factores del complemento en la muestra de CSF, siendo el par de factores del complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento y un factor del complemento seleccionado del grupo que comprende el complemento C9, factor B (FB) del complemento, complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8 y/o complemento C3. En una realización del primer, segundo y tercer aspecto, se mide la cantidad de tres factores de complemento en la muestra de CSF, siendo la combinación de tres factores de MAC del complemento, factor B del complemento y complemento C3.
- En una realización del primer, segundo y tercer aspecto, la medición se lleva a cabo con cualquiera de los siguientes ensayos seleccionados del grupo que comprende un sistema de ensayo rápido en el punto de atención (POC), un sistema de flujo lateral, un inmunoensayo y un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).
- En un cuarto aspecto, la invención proporciona una tira seca para su uso en el método del primer, segundo o tercer aspecto, la tira seca capaz de absorber un fluido aplicado a la misma por capilaridad dentro de la tira, comprendiendo dicha tira, en una dirección aguas arriba (en un primer extremo) a aguas abajo (en un segundo extremo) y en el siguiente orden: 1) una zona de aplicación de la muestra, 2) una zona de reacción, y 3) una zona de detección, en la que dicha zona de reacción comprende un primer anticuerpo específico marcado no inmovilizado contra un epítipo de una proteína en el MAC del complemento, que puede comprender el complemento C5b, C6, C7, C8 y/o C9, eficaz para formar con él, un complejo móvil de MAC del complemento/anticuerpo, y dicha zona de detección comprende un segundo anticuerpo inmovilizado específico contra un epítipo de un MAC del complemento en dicho complejo, en el que dicho primer y segundo anticuerpos son específicos para diferentes epítopos en la misma proteína en el MAC del complemento y en el que, después de la aplicación de una muestra de fluido corporal a la zona de aplicación de la muestra en el primer extremo, (i) la muestra migra en una dirección aguas abajo en la tira hacia la zona de reacción, (ii) la proteína en el MAC del complemento en la muestra reacciona con el primer anticuerpo previamente presente en la zona de reacción para formar un complejo móvil, MAC del complemento/anticuerpo marcado, (iii) el complejo móvil, MAC del complemento/anticuerpo marcado migra hacia la zona de detección en el segundo extremo, y (iv) el complejo móvil, MAC del complemento/anticuerpo marcado se une al segundo anticuerpo inmovilizado previamente presente en la zona de detección, inmovilizando así dicho complejo en la zona de detección.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral para su uso en el método del primer, segundo o tercer aspecto, para detectar un marcador, que comprende: una tira de membrana; un anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo del marcador, en el que opcionalmente el anticuerpo de detección comprende un marcador que proporciona una señal; una línea de prueba que comprende un anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo del marcador; y una línea de control que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control, en el que el marcador es una proteína en el MAC del complemento, opcionalmente un marcador seleccionado del grupo que consiste en: proteína del complemento C9, factor B de la proteína del complemento, proteína del complemento C5b, proteína del complemento C6, proteína del complemento C7, proteína del complemento C8, proteína del complemento C3 y cualquier combinación de las mismas.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral para su uso en el método del primer, segundo o tercer aspecto, que comprende: una tira de membrana; un primer anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en c MAC del complemento; una primera línea de prueba que comprende un primer anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la primera proteína; un segundo anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8, complemento C9, complemento C3 y factor B de la proteína del complemento, en el que dicha segunda proteína es diferente de dicha primera proteína; una segunda línea de prueba que comprende un segundo anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la segunda proteína; y al menos una línea de control que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control.

En una realización del sexto aspecto, el dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral comprende además un tercer anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una tercera proteína seleccionada del grupo que consiste en complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8, complemento C9, complemento C3 y factor B de la proteína del complemento, en el que dicha tercera proteína es diferente de dicha primera proteína y dicha segunda proteína, y una tercera línea de prueba que comprende un tercer anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la tercera proteína.

En una realización del sexto aspecto, el dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral comprende además un cuarto anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una cuarta proteína seleccionada del grupo que consiste en complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8, complemento C9, complemento C3 y factor B de la proteína del complemento, en el que dicha cuarta proteína es diferente de dicha primera proteína y dicha segunda proteína y dicha tercera proteína, y una cuarta línea de prueba que comprende un cuarto anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la cuarta proteína.

En una realización del quinto o sexto aspecto, cada uno de los anticuerpos de detección comprende un marcador que proporciona una señal diferente que distingue a cada uno de dichos anticuerpos de detección entre sí.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Comparación del coste y el periodo de tiempo entre un estudio de diagnóstico estándar para la meningitis bacteriana y una realización ejemplar de la presente invención, que es un ensayo de flujo lateral, mostrado en una configuración de casete.

Figura 2. Concentraciones de complemento C3 y factor B (FB) en el CSF de pacientes con meningitis infecciosa o controles. Los niveles en CSF de C3 (Panel A) y FB (Panel B) se midieron mediante ELISA en 20 pacientes con meningitis bacteriana confirmada, 21 pacientes con meningitis aséptica y 63 pacientes de control. Los niveles de C3 y FB en CSF en pacientes con meningitis bacteriana estaban significativamente elevados en comparación con aquellos con meningitis aséptica o con los controles ($p < 0.001$, prueba de suma de rangos de Wilcoxon para todas las comparaciones). Las líneas horizontales continuas indican el nivel medio de proteína del complemento para cada grupo. La línea punteada es la media ± 2 SD del grupo de meningitis aséptica y se usa para diferenciar entre meningitis bacteriana y aséptica.

Figura 3. Concentraciones de C5b-9 (MAC) en el CSF de pacientes con derivación/EVD con y sin infección. Los niveles de MAC en CSF se midieron mediante ELISA en 3 pacientes con infección bacteriana confirmada y 24 pacientes sin infección. Los niveles de MAC en CSF en pacientes con infección bacteriana estaban significativamente elevados en comparación con aquellos sin infección ($p < 0.0002$, prueba t no apareada). La línea es la media ± 2 SD del grupo infectado y se usa para diferenciar entre los grupos infectados y no infectados.

Figura 4. Cambios en los niveles de MAC en CSF en función del tiempo en un paciente con infección de la derivación. Los niveles de MAC en CSF se cuantificaron usando un ELISA específico para MAC soluble (Quidel Corp., San Diego, CA). Las muestras se diluyeron según fue necesario para obtener datos cuantificables y las muestras duplicadas se analizaron según las instrucciones del fabricante.

Figura 5. Cambios en los niveles de MAC soluble en CSF en pacientes con infección bacteriana, aséptica o criptocócica confirmada. Los niveles de MAC en CSF se midieron mediante ELISA en 2 pacientes con meningitis bacteriana confirmada (según la evaluación mediante cultivo bacteriano), 73 pacientes asépticos (negativos por cultivo

bacteriano) y 1 paciente con infección criptocócica confirmada. Los niveles de MAC en CSF en pacientes con infección bacteriana estaban significativamente elevados en comparación con los pacientes asépticos con niveles de MAC detectables ($p < 0.0001$, prueba t para datos no apareados). La línea punteada representa la media $\pm$ 2 SD de los niveles de MAC en CSF detectables en pacientes asépticos y se usa para discriminar entre meningitis bacteriana y aséptica. Las muestras se diluyeron según fue necesario para obtener datos cuantificables y las muestras duplicadas se analizaron según las instrucciones del fabricante.

Figura 6. Cambios en los niveles de MAC en CSF en pacientes con infecciones de la derivación, agrandamiento ventricular (VE) asintomático, agrandamiento ventricular sintomático (SVE, "falla de la derivación") y normales. Los niveles de MAC en CSF en pacientes normales fueron indetectables por ELISA en 3 pacientes. De manera similar, los niveles de MAC en CSF fueron esencialmente indetectables en pacientes con VE asintomáticos (solo 1 de cada 8 pacientes tenía niveles de MAC detectables). Por contrato, los pacientes con SVE tenían niveles elevados de MAC en CSF y MAC detectable en 22 de 35 pacientes, mientras que los niveles de MAC en CSF en 6 pacientes con infección bacteriana confirmada estaban significativamente elevados en comparación con los pacientes con SVE ($p < 0.0001$, prueba t para datos no apareados). Las muestras se diluyeron según fue necesario para obtener datos cuantificables y las muestras duplicadas se analizaron según las instrucciones del fabricante.

Figura 7. Cambios en los niveles de C3 en CSF en pacientes con infecciones de la derivación, agrandamiento ventricular (VE) asintomático, agrandamiento ventricular sintomático (SVE, "falla de la derivación") y normales. Los niveles de C3 en CSF en pacientes con VE normales y asintomáticos fueron bajos según la evaluación mediante ELISA. Por el contrario, los pacientes con SVE tenían niveles elevados de C3 en el CSF, con C3 detectable en todos los pacientes, mientras que los niveles de C3 en el CSF en 3 pacientes con infección bacteriana confirmada estaban significativamente elevados en comparación con los pacientes con SVE ($p < 0.017$, prueba t no apareada). Las muestras se diluyeron según fue necesario para obtener datos cuantificables y las muestras duplicadas se analizaron según las instrucciones del fabricante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación. Esta descripción no pretende ser un catálogo detallado de todas las diferentes formas en las que se puede implementar la invención, o todas las características que se pueden agregar a la presente invención. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una realización se pueden incorporar a otras realizaciones.

A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diversas características de la invención descritas en este documento se puedan usar en cualquier combinación.

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la meningitis bacteriana se puede diferenciar de la meningitis aséptica en un sujeto detectando cambios en los niveles de proteínas del complemento específicas en el líquido cefalorraquídeo (CSF) del sujeto. La presente invención proporciona un ensayo de flujo lateral (LFA) en el punto de atención basado en la inducción bacteriana, pero no viral, de proteínas específicas del complemento. El LFA de esta invención demuestra una alta especificidad y sensibilidad para diagnosticar meningitis bacteriana usando biomarcadores del complemento. El LFA de esta invención ofrece ventajas significativas sobre los métodos de laboratorio convencionales actualmente en uso, tales como 1) facilidad de uso, permitiendo que esencialmente todo el personal médico realice el ensayo; 2) resultados rápidos, in situ (en el punto de atención) disponibles en minutos en la sala de emergencias (ER) o en clínicas rurales/remotas o centros de atención; 3) costes de laboratorio clínico sustancialmente reducidos; y 4) ausencia de equipos, reactivos o requisitos de almacenamiento especializados. Las pruebas de diagnóstico de esta invención permiten a un médico iniciar regímenes de tratamiento apropiados, lo que resulta en un ahorro sustancial de costes de atención médica, por ejemplo, minimizando o previniendo el tratamiento médico y la hospitalización innecesarios (véase, por ejemplo, la figura 1).

Aunque la respuesta del complemento es un sistema de defensa importante contra la enfermedad, varias características dificultan la medición precisa de las proteínas del complemento, particularmente en un periodo de tiempo clínicamente relevante. Las tecnologías conocidas requieren al menos alrededor de una hora y, a menudo, dos horas o más para determinar los niveles de proteína del complemento. Durante este tiempo, puede estar ocurriendo un deterioro significativo de la condición de un paciente que no se manifiesta visiblemente hasta que se ha producido un daño significativo, o incluso irreversible. Adicionalmente, se sabe que las proteínas del complemento se activan fácilmente mediante la manipulación y otras condiciones experimentales que pueden afectar significativamente los resultados del ensayo. Además, el paso del tiempo es un factor significativo en la activación espontánea del complemento, incluso sin manipulación.

La presente invención proporciona tecnologías que abordan estas fuentes de problemas no identificadas previamente. Por ejemplo, la presente invención proporciona

métodos en los que se pueden realizar pasos relevantes dentro de un periodo de tiempo restringido. Según la presente invención, tales métodos proporcionan ventajas que incluyen minimizar la activación espontánea del complemento y, de forma alternativa o adicional, proporcionar datos clínicamente relevantes dentro de un periodo de tiempo, medido desde el inicio de la recogida de muestras de un sujeto, que se reduce sustancialmente en comparación con las

metodologías estándar. De manera adecuada, los ensayos de esta invención se pueden completar dentro de un periodo de tiempo, medido desde el inicio de la recolección de muestras de un sujeto, que es menos de aproximadamente 120 minutos o menos, 75 minutos o menos, 60 minutos o menos, aproximadamente 50 minutos o menos, aproximadamente 40 minutos o menos, aproximadamente 30 minutos o menos, aproximadamente 20 minutos o menos, aproximadamente 10 minutos o menos, o aproximadamente 5 minutos o menos o aproximadamente 3 minutos o menos. Actualmente no hay ninguna prueba, ensayo o protocolo disponible que permitiría un tiempo de respuesta tan rápido, por lo tanto, informar a los médicos en tiempo real sobre el diagnóstico, el tratamiento y/o pruebas adicionales. De este modo, la presente invención proporciona métodos que son mejoras sustanciales sobre los protocolos actuales para identificar y/o diagnosticar sujetos de esta invención y sobre el estándar actual de cuidado y tratamiento de tales sujetos.

El complemento es notoriamente fastidioso y puede activarse en virtud de procedimientos de análisis estándar (manipulación, almacenamiento y exposición a materiales extraños que entran en contacto con C3 durante el análisis). El complemento es muy eficaz para lisar microbios invasores e iniciar la respuesta de cicatrización de heridas en los sitios de la lesión. Esta eficacia se debe en parte a la capacidad del C3 de ser activado por materiales extraños, tales como los componentes de la pared celular bacteriana. Si bien esta propiedad es útil para dirigir una respuesta inmune a nuevos patógenos extraños, esta misma propiedad presenta desafíos formidables para el estudio experimental y de diagnóstico. Los materiales tales como los plásticos usados en la manipulación de muestras, la manipulación de la propia muestra y las condiciones de almacenamiento inadecuadas también pueden desencadenar la activación del complemento. Cuantas más etapas de procesamiento y manipulación se requieran para realizar un ensayo dado, se pueden esperar más falsos positivos debido a la activación del complemento en virtud del ensayo en sí. Tales falsos positivos complican las pruebas tradicionales y hacen que los métodos de prueba actuales no sean apropiados para su uso en la dirección de la atención del paciente casi en tiempo real.

El sistema del complemento comprende más de 40 proteínas séricas y celulares y desempeña funciones importantes en la inmunidad innata y adaptativa. Hay cuatro vías principales de activación del complemento. La vía clásica es activada principalmente por complejos inmunes, específicamente anticuerpos IgG/IgM unidos al antígeno. Otros activadores incluyen lipopolisacárido, mielina, compuestos polianiónicos, proteína C reactiva (CRP) y ADN y ARN microbianos. La vía de la lectina es activada por polisacáridos con grupo manosa libre y otros azúcares comunes a hongos y bacterias. La vía alternativa está mediada por la activación directa de C3 por sustancias "extrañas" que a menudo incluyen componentes de la pared celular microbiana. Las tres vías principales de activación del complemento convergen en el componente de complemento de proteína central 3 (C3). C3 es un mediador central de la inflamación y es activado por la mayoría de los factores que provocan la inflamación. La vía clásica por lo general es desencadenada por inmunocomplejos, que son complejos de antígenos unidos a anticuerpos, que generalmente pertenecen a los isotipos IgM o IgG. Los inmunocomplejos, a su vez, se unen al componente C1 del complemento, que se compone de C1q, C1r y C1s. La unión de C1q a un complejo anticuerpo-antígeno desencadena la activación de C1r y C1s. Los C1 activados luego escinden el componente C4 para producir C4a y C4b. C4b es capaz de unirse covalentemente a las superficies celulares, aunque solo el cinco por ciento lo hace. El 95 por ciento restante reacciona con el agua para formar un C4b activado soluble. El componente 2 del complemento puede entonces asociarse con C4b, después de lo cual es activado por C1 a C2a y C2b. C4b y C2a se combinan para formar C4bC2a, la C3 convertasa de la vía clásica (CP).

La convertasa CP C3 escinde C3 para formar C3a y C3b. Al igual que el C4b activado, el C3b puede unirse covalentemente a las superficies celulares o reaccionar con H₂O y permanecer en solución. C3b activado tiene múltiples roles. Por sí mismo, puede servir como opsonina para hacer que la célula o partícula decorada sea más fácil de ingerir por los fagocitos. Además, C3b se puede asociar con C4bC2a (la convertasa CP C3) para formar una convertasa C5. El complejo, denominado C4bC2aC3b, se denomina convertasa CP C5. Alternativamente, C3b puede formar el núcleo u otra convertasa C3 llamada convertasa C3 de la vía alternativa (AP).

La vía alternativa (AP) es otro mecanismo por el cual C3 se puede activar. Por lo general se activa mediante objetivos tales como superficies microbianas y diversos polisacáridos complejos y otros materiales. Esta vía alternativa también se puede iniciar espontáneamente por la escisión del enlace tioéster en C3 por una molécula de agua para formar C3(H₂O), C3(H₂O) se une al factor B, lo que permite que el factor D divida el factor B en Ba y Bb. Bb permanece asociado con C3(H₂O) para formar el complejo C3(H₂O)Bb, que actúa como una convertasa C3 y escinde C3, dando como resultado C3a y C3b.

El C3b formado ya sea a través de este procedimiento o mediante las vías clásicas o de lectina se une a los objetivos (por ejemplo, en las superficies celulares) y forma un complejo con el factor B, que posteriormente se escinde por el factor D y forma Bb, lo que da como resultado C3bBb, que se denomina convertasa C3 de la vía alternativa (AP). La unión de otra molécula de C3b a la convertasa AP C3 produce C3bBbC3b, que es la convertasa AP C5.

La vía del complemento de lectina se inicia mediante la unión de lectina de unión a manosa (MBL) y serina proteasa asociada a MBL (MASP) a carbohidratos. El gen MBL1 (conocido como LMAN1 en humanos) codifica una proteína de membrana integral de tipo 1 localizada en la región intermedia entre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi. El gen MBL2 codifica la proteína de unión a manosa soluble que se encuentra en el suero. En la vía de la lectina humana, MASP1 y MASP2 están implicadas en la proteólisis de C4 y C2, lo que conduce a la convertasa C3, que conduce a la producción de una convertasa C5 como se describió anteriormente para la CP.

- La convertasa C5 generada a través de cualquiera de estas tres vías escinde C5 para producir C5a y C5b. Luego, C5b se une a C6, C7 y C8, que catalizan la polimerización de C9 para formar el complejo de unión a membrana (MAC) C5b-9. El MAC de ensamblaje se inserta en la membrana de la célula diana, formando un poro delimitado por un anillo de moléculas C9. La formación de MAC causa la lisis celular de los microbios invasores, la formación de MAC en las células huésped también puede causar lisis, pero no necesariamente. Cantidades sublétricas de MAC en la membrana de las células pueden afectar la función celular en una variedad de formas. Los productos de escisión pequeña C3a, C4a y C5a son anafilatoxinas y median múltiples reacciones en la respuesta inflamatoria aguda. C3a y C5a también son potentes factores quimiotácticos que atraen a las células del sistema inmunológico, tal como los neutrófilos y los macrófagos, al área de crisis.
- La vía de la proteasa extrínseca es una vía de activación del complemento caracterizada más recientemente que activa directamente C3 y C5 a través de la acción enzimática de una o más enzimas de coagulación activadas que incluyen trombina, plasmina y factores activados IX, X y XII. La activación de C3 y 5 a través de esta vía genera C3a, C3b, C5a y C5b funcionalmente activas en ausencia de las convertasas C3 y C5 canónicas formadas a través de la activación de las otras tres vías del complemento.
- El componente del complemento C3 es útil como un biomarcador de alerta general de que el cuerpo está respondiendo a alguna forma de crisis fisiológica, tal como una lesión, una infección u otro procedimiento patológico. De manera similar, el componente del complemento C9 es un biomarcador único en el líquido cefalorraquídeo en virtud de su capacidad, en asociación con las proteínas del complemento C5b-c9 en el complejo MAC, para lisar cepas bacterianas susceptibles que pueden causar meningitis bacteriana. La lisis mediada por el complemento (C9) da como resultado la liberación de la pared celular bacteriana y los componentes intracelulares, que activan directamente los mecanismos inflamatorios inmunitarios innatos que contribuyen a la gravedad de la meningitis. El complemento se ha asociado con una amplia variedad de enfermedades, que incluyen lupus, artritis, hemorragia intracraneal, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedades cardíacas y degeneración macular relacionada con la edad. En muchos casos, la gravedad de la enfermedad se correlaciona con el nivel de activación del complemento. En algunos casos, el complemento puede desempeñar un papel en la patología de la enfermedad. En estos casos, el cuerpo no puede controlar con éxito la causa de la inflamación, que se propaga desde el sitio local de la lesión hasta la inflamación sistémica. La activación del complemento puede dañar directamente el tejido o hacerlo indirectamente al sobreactivar las células y reclutar células inmunes que a su vez causan la destrucción del tejido. Los ejemplos de sobreactivación incluyen choque anafiláctico, falla orgánica múltiple (MOF), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).
- Los ensayos y métodos de la presente invención proporcionan varias ventajas sobre los ensayos y métodos de complemento previos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos y métodos actuales son apropiados para su uso en el punto de atención (POC) y producen resultados en cuestión de minutos, en lugar de horas. El rápido retorno de los resultados permite al médico actuar casi en tiempo real para dirigir la atención al paciente. Los ensayos y métodos de esta invención son fáciles de usar y no requieren la disponibilidad de un laboratorio o un técnico de laboratorio capacitado. Adicionalmente, los ensayos y métodos de esta invención requieren menos etapas de manipulación y, de este modo, minimizan la activación del complemento debido a la manipulación y el procesamiento, lo que conduce a resultados de prueba falsos positivos.
- Los ejemplos no limitantes de otros regímenes de tratamiento para un sujeto identificado con meningitis bacteriana según los métodos descritos en este documento incluyen modificar la duración, el tipo y/o la cantidad de la terapia con antibióticos; terapias auxiliares con fluidos intravenosos, etc.; modificar la duración y/o la cantidad de la terapia con dexametasona; terapia anticomplemento y/o terapia antiinflamatoria en combinación con o en lugar de terapia con antibióticos; y/o modificar la duración y/o cantidad de terapia auxiliar, terapia anticomplemento y/o terapia antiinflamatoria. Otros regímenes de tratamiento que se podrían modificar incluyen la necesidad de realizar imágenes por CT o MRI del cerebro (para la identificación de infarto, absceso, hidrocefalia y otras afecciones) y análisis repetido del CSF en el caso de infecciones resistentes y/o complicadas.
- Se conocen en la técnica muchos inhibidores del complemento y son apropiados para su uso con los métodos de la presente invención. El inhibidor del complemento se puede seleccionar del grupo que consiste en inhibidores naturales del complemento y derivados de los mismos, compstatina y análogos de la misma, anticuerpos complejo de ataque antimembrana (MAC), anticuerpos anti-C3, anticuerpos anti-C5, antagonistas del receptor C3a y antagonistas del receptor C5a. Se pueden encontrar ejemplos de inhibidores del complemento adicionales, por ejemplo, en Emlen et al. "Therapeutic complement inhibition: new developments" *Semin. Thromb. Hemost.* 36(6):660-68 (2010); Wagner et al. "Therapeutic potential of complement modulation" *Nat. Rev. Drug Discov.* 9(1):43-56 (2010); y Ricklin et al. "Complement-targeted therapeutic" *Nat. Biotechnol.* 25(11):1265-75 (2007).
- Los ejemplos no limitantes de otros regímenes de tratamiento para un sujeto identificado con meningitis aséptica según los métodos descritos en este documento incluyen la reducción de la duración de la hospitalización y/o la administración de antibióticos, terapias auxiliares, terapia con dexametasona, terapias antiinflamatorias y anticomplemento, la necesidad de imágenes cerebrales y la frecuencia de contacto con el médico tratante.
- Los métodos de esta invención también se pueden usar para modificar protocolos estándar para diagnosticar meningitis bacteriana. Actualmente, el estudio de diagnóstico estándar incluye una tinción de Gram, medición de

glucosa, medición de proteínas, recuento de glóbulos blancos (WBC), cultivo y posiblemente PCR, todo en una muestra de CSF obtenida de un sujeto. Los métodos de esta invención se pueden llevar a cabo en una muestra de CSF de un sujeto como prueba inicial y si se detecta un nivel elevado de al menos el complejo de ataque a la membrana, (MAC) en la muestra de CSF, diferenciando así

- 5 la meningitis en el sujeto como meningitis bacteriana, la prueba posterior puede incluir, por ejemplo, una tinción de Gram y/o cultivo del patógeno bacteriano que está causando la meningitis

bacteriana, por ejemplo, para determinar el mejor régimen de antibióticos.

Las etapas adicionales, que se pueden llevar a cabo, incluyen tratar al sujeto

- 10 con antibióticos y/u otros agentes terapéuticos, hospitalizar al sujeto, etc. Los métodos de la invención permiten además la identificación de una infección asociada con una derivación permanente y/o dispositivo extraventricular en un sujeto que puede no presentar síntomas de dicha infección y/o para el que no se ha determinado o es difícil determinar una fuente de infección. El empleo de los métodos puede informar al médico sobre si se necesita tratamiento y/o qué enfoque de tratamiento tomar. Mediante el uso de los métodos descritos en este documento, un médico puede tener información sobre si

- 15 el sujeto tiene una infección en un periodo de tiempo mucho más corto que el que ocurriría según los protocolos actuales para el diagnóstico (por ejemplo, esperando los datos del cultivo). De este modo, al usar los métodos

el sujeto puede recibir tratamiento antes si se identifica una infección o si se puede evitar un tratamiento innecesario (por ejemplo, con antibióticos), que puede prescribirse porque se sospecha una infección pero aún no se ha verificado (por ejemplo, mediante resultados de cultivo). Empleando

- 20 los métodos descritos en este documento, se puede identificar un sujeto que se beneficiaría de la intervención médica incluso si el sujeto no manifiesta o muestra síntomas de un problema o complicación o condición inflamatoria y/o infección asociada con una derivación permanente y/o dispositivo extraventricular. Dicho sujeto se podría tratar profilácticamente (por ejemplo, con antibióticos, esteroides, agentes antiinflamatorios, etc.). Se puede llevar a cabo un cultivo del CSF del sujeto para determinar si el sujeto tiene una infección y si los resultados del cultivo identifican una
25 infección, el sujeto puede recibir tratamiento para la infección. Un sujeto identificado según los métodos descritos en este documento que tiene una derivación permanente y/o un dispositivo extraventricular que funciona incorrectamente se puede someter a lavado de la derivación y/o el dispositivo, extracción o reemplazo de la derivación y/o dispositivo, etc. Un sujeto identificado según los métodos que se describen en este documento, se puede someter a análisis de imágenes y/u otras pruebas para buscar cambios en el tamaño del ventrículo, sangrado en el cerebro, etc. De este
30 modo, el beneficio de los métodos es que un sujeto puede ser identificado como un sujeto que necesita esas pruebas y/o intervención médica cuando no hay otros indicadores de que el sujeto tiene tal necesidad. Actualmente no existe ninguna prueba o protocolo disponible para identificar tales sujetos y/o realizar pruebas y/o tratamientos en base a la información sobre los niveles de proteínas del complemento en el CSF de tales sujetos.

De manera adecuada, solo se puede medir la cantidad de

- 35 MAC del complemento en la muestra de CSF.

De manera adecuada, se pueden medir la cantidad de

MAC del complemento y la cantidad de complemento C9 en la muestra de CSF.

De manera adecuada, se pueden medir la cantidad de

MAC del complemento y la cantidad de complemento C3 en la muestra de CSF.

- 40 De manera adecuada, se pueden medir la cantidad de

MAC del complemento y la cantidad de factor B del complemento en la muestra de CSF.

De manera adecuada, se pueden medir la cantidad de

MAC del complemento, la cantidad de factor B del complemento y la cantidad de complemento C3 en la muestra de CSF.

- 45 De manera adecuada, la etapa de medición

se puede realizar con un sistema de ensayo rápido de punto de contacto (POC).

De manera adecuada, la etapa de medición

se puede realizar con un sistema de flujo lateral.

De manera adecuada, la etapa de medición

se puede llevar a cabo con un inmunoensayo.

De manera adecuada, la etapa de medición

se puede llevar a cabo con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

5 El nivel medio de complemento C3 en una muestra de CSF de un control (por ejemplo, un sujeto sano o no infectado) es de 2.5 microgramos/ml. En sujetos con meningitis bacteriana, el nivel medio de complemento C3 en una muestra de CSF es de 48 microgramos/ml. En los métodos de la presente invención, un nivel de referencia de complemento C3 en una muestra de CSF es aproximadamente 10 microgramos/ml. Por lo tanto, un nivel de complemento C3 en una muestra de CSF de más de 10 microgramos/ml se aumenta en relación con el control e identifica a un sujeto con meningitis que tiene meningitis bacteriana en lugar de meningitis aséptica. Un nivel de complemento C3 en una muestra de CSF de menos de 10 microgramos/ml identifica a un sujeto con meningitis con meningitis aséptica en lugar de meningitis bacteriana.

10 El nivel medio del factor B (FB) del complemento en una muestra de CSF de un control (por ejemplo, un sujeto sano o no infectado) es de 0.5 microgramos/ml. En sujetos con meningitis bacteriana, el nivel medio de FB del complemento en una muestra de CSF es de 16 microgramos/ml. En los métodos de la presente invención, un nivel de referencia de complemento C3 en una muestra de CSF es de aproximadamente 1.0 microgramo/ml. Por lo tanto, un nivel de FB del complemento en una muestra de CSF de más de 1.0 microgramo/ml aumenta en relación con el control e identifica que un sujeto con meningitis tiene meningitis bacteriana en lugar de meningitis aséptica. Un nivel de FB del complemento en una muestra de CSF de menos de 1.0 microgramo/ml identifica a un sujeto con meningitis con meningitis aséptica en lugar de meningitis bacteriana.

15 El nivel de complemento C9 en una muestra de CSF de control (por ejemplo, un sujeto sano o no infectado) puede estar en un intervalo de aproximadamente 200 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml. En los métodos de la presente invención, el nivel de referencia de complemento C9 en una muestra de CSF es aproximadamente 500 ng/ml. Por lo tanto, un nivel de complemento C9 en una muestra de CSF de más de 500 ng/ml aumenta en relación con el control e identifica que un sujeto con meningitis tiene meningitis bacteriana en lugar de meningitis aséptica. Un nivel de complemento C9 en una muestra de CSF de menos de 500 nanogramos/ml identifica a un sujeto con meningitis con meningitis aséptica en lugar de meningitis bacteriana.

20 De manera adecuada, el nivel de MAC del complemento en una muestra de CSF o un control (por ejemplo, un sujeto sano o no infectado o un sujeto sin una derivación permanente y/o dispositivo extraventricular) puede ser inferior a aproximadamente 10 ng/ml.

25 De manera adecuada, el nivel de MAC del complemento en una muestra de CSF de un sujeto con falla de la derivación y/o una complicación asociada con una derivación permanente y/o un sujeto con mayor riesgo de desarrollar una infección asociada con una derivación permanente y/o dispositivo extraventricular puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml. De este modo, un valor umbral para identificar a dicho sujeto puede ser un nivel de MAC del complemento en el CSF de más de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 200 ng/ml pero menos de aproximadamente 240, 245, o 250 ng/ml.

30 De manera adecuada, el nivel de MAC del complemento en una muestra de CSF de un sujeto con una infección bacteriana (por ejemplo, meningitis bacteriana, una infección bacteriana asociada con una derivación permanente o un dispositivo extraventricular) puede ser, por ejemplo, mayor que 250 ng/ml. De este modo, un valor umbral para identificar a dicho sujeto puede ser un nivel de MAC del complemento en el CSF de más de 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1000, 2000, 3000, o 4000 ng/ml.

35 En los métodos de esta invención, también se puede determinar un valor umbral como un aumento porcentual sobre un valor de control, por ejemplo, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 % o incluso 1000 % mayor o aumentado sobre un valor de control.

40 Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo contra el complemento C3 que se puede emplear en los métodos y ensayos de esta invención incluyen los anticuerpos enumerados en la tabla 1 en este documento, así como cualquier otro anticuerpo contra el complemento C3 ahora conocido o identificado posteriormente. Estos anticuerpos se pueden usar en los métodos y ensayos de esta invención en cualquier combinación de C3.

45 Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo contra el factor B del complemento que se pueden emplear en los métodos y ensayos de esta invención incluyen un anticuerpo de Hycult identificado como factor B/Bb del complemento, humano, mAb M13/12, HM2256; un anticuerpo de Comptech identificado como factor B anti-humano de cabra, No. de catálogo A235; un anticuerpo de Abcam identificado como un anticuerpo anti-factor B (ab182924; policlonal de cabra contra el Factor B); un anticuerpo de Abcam identificado como un anticuerpo anti-factor B (ab72658; policlonal de conejo contra el factor B); y un anticuerpo de Abcam identificado como anticuerpo anti-factor B (ab190494; policlonal de cabra contra

el factor B), así como cualquier otro anticuerpo contra el factor B del complemento ahora conocido o identificado más tarde. Estos anticuerpos se pueden usar en los métodos y ensayos de esta invención en cualquier combinación de anticuerpos FB. De manera adecuada, el anticuerpo se puede unir a Bb.

Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo contra el complemento C9 que se puede emplear en los métodos y ensayos de esta invención incluyen un anti-C9 policlonal de conejo producido en ratón contra la secuencia peptídica CMPIPVSRREEQEQHYPIPID. Este anticuerpo C9 reacciona de forma cruzada con el complemento humano C9. Otros ejemplos de un anticuerpo contra el complemento C9 que se pueden emplear en los métodos y ensayos de esta invención incluyen un anticuerpo de Hycult identificado como C9, humano, mAb X197, HM2111; un anticuerpo de Hycult identificado como neoantígeno C9, humano, mAb WU 13-15, HM2264; un anticuerpo de Comptech identificado como Goat Anti-Human C9, No. de catálogo A226; un anticuerpo de Quidel identificado como C9 # A310 antihumano de cabra; un anticuerpo de Quidel identificado como C9 # A223 anti-humano de ratón; un anticuerpo de Abcam identificado como anticuerpo Anti-C9 (ab118902; policlonal de conejo a C9); un anticuerpo de Abcam identificado como anticuerpo Anti-C9 (ab92690; policlonal de conejo a C9); y un anticuerpo de Abcam identificado como anticuerpo Anti-C9 (ab53896; policlonal de oveja contra C9), así como cualquier otro anticuerpo contra el complemento C9 ahora conocido o identificado posteriormente. Estos anticuerpos se pueden usar en los métodos y ensayos de esta invención en cualquier combinación de C9.

Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo para MAC del complemento que se puede emplear en los métodos y ensayos y dispositivos de esta invención incluyen un anticuerpo para C5, C5b, C6, C7, C8, C9 y cualquier combinación de los mismos. Un anticuerpo contra el MAC del complemento puede ser un anticuerpo que se une a C5, C5b, C6, C7, C8 y/o C9 cuando estas proteínas del complemento respectivas están presentes en el MAC del complemento. Por ejemplo, un anticuerpo del MAC del complemento puede ser un anticuerpo que se une a un neoepítipo en el complemento C9 que está presente cuando el complemento C9 es parte del MAC del complemento. Un anticuerpo para el MAC del complemento puede incluir un anticuerpo que se une a un neoepítipo presente en cualquiera de las proteínas del complemento C5, C5b, C6, C7, C8 o C9 cuando estas proteínas son parte del MAC del complemento.

Los anticuerpos contra C3, anticuerpos contra FB para MAC del complemento y anticuerpos contra C9 como se describen en este documento se pueden emplear en los métodos y ensayos de esta invención.

Adicionalmente, cuando se emplean anticuerpos, los anticuerpos

que se unen al complemento C9, los anticuerpos que se unen a C3, los anticuerpos que se unen a MAC y los anticuerpos que se unen a FB no son sustancialmente reactivos cruzados. Los anticuerpos empleados en los métodos y ensayos de esta invención pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales, en cualquier combinación.

Los métodos descritos en este documento se pueden llevar a cabo

usando un sistema de inmunoensayo. Los

métodos descritos en este documento se pueden llevar a cabo usando un sistema de ensayo rápido de punto de contacto (POC). Los

métodos de esta invención se pueden llevar a cabo usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Los métodos de esta invención se pueden llevar a cabo usando un sistema de flujo lateral.

El primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden estar

presentes en la tira seca antes de la aplicación de la muestra de fluido corporal a la tira seca.

El primer anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal y el

segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. Tanto el primer anticuerpo como el segundo anticuerpo pueden ser anticuerpos monoclonales.

La tira seca se puede configurar

para detectar o medir MAC o configurarse para detectar o medir dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) proteínas del complemento. (por ejemplo, C3 y C9, C3 y FB, C9 y FB, C3 y C9 y FB, C3) y una o más proteínas MAC, FB y una o más proteínas MAC, o dos o más de cualquiera de las proteínas MAC C5b, C6, C7, C8 y C9 en cualquier combinación. Las dos o más proteínas del complemento se pueden detectar en la tira seca en serie. Por ejemplo, se pueden disponer varias líneas de prueba en serie en una sola tira seca.

El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral descrito en este documento puede

comprender además un tercer anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una tercera proteína seleccionada del grupo que consiste en complemento C9, complemento C3, factor B de la proteína del complemento y MAC del complemento, en el que dicha tercera proteína es diferente de dicha primera proteína y dicha segunda

proteína, y una tercera línea de prueba que comprende un tercer anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la tercera proteína.

El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral descrito en este documento puede

5 comprender un cuarto anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una cuarta proteína seleccionada del grupo que consiste en complemento C9, complemento C3, factor B de la proteína del complemento y MAC del complemento (por ejemplo, C5b, C6, C7, C8 y/o C9), en el que dicha cuarta proteína es diferente de dicha primera proteína y dicha segunda proteína y dicha tercera proteína, y una cuarta línea de prueba que comprende un cuarto anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la cuarta proteína.

10 El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral descrito en este documento puede comprender anticuerpos de detección en los que cada anticuerpo de detección respectivo comprende un marcador que proporciona una señal diferente que distingue cada uno de dichos anticuerpos de detección entre sí.

15 El médico puede detectar una disminución en una o más proteínas del complemento descritas en este documento en una muestra del sujeto durante el tratamiento del sujeto. De acuerdo con lo anterior, el médico puede modificar el tratamiento del sujeto ajustando la dosificación de medicamentos, tales como antibióticos, agentes antiinflamatorios y/o inhibidores del complemento, o interrumpiendo el tratamiento una vez que los niveles del complemento hayan vuelto a la normalidad.

20 El médico puede detectar un aumento en una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) proteínas del complemento descritas en este documento en una muestra de un sujeto durante el tratamiento del sujeto. De acuerdo con lo anterior, luego el médico puede modificar el régimen de tratamiento del sujeto, por ejemplo, aumentando la dosificación de medicamentos, tales como antibióticos, agentes antiinflamatorios y/o inhibidores del complemento, hasta que se logre una estabilización o disminución deseada en los niveles de proteína del complemento. Si no se detecta ningún cambio en el nivel de proteína del complemento en una muestra del sujeto durante el tratamiento, el médico puede modificar el régimen de tratamiento del sujeto o puede mantener el régimen de tratamiento del sujeto hasta que se observe un cambio en los niveles de proteína del complemento.

25 Un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral puede estar compuesto por una tira de membrana de celulosa, sobre la cual se coloca una almohadilla de muestra

30 para absorber el fluido de la muestra y permitir la migración gradual de los complejos inmunes conjugados de muestra y partícula, una mecha en el extremo distal de la tira que absorbe la muestra líquida y el material conjugado para facilitar la migración capilar a través de la tira de membrana de celulosa, y una almohadilla de partículas conjugadas que comprende un anticuerpo de detección unido a un marcador o conjugado de detección. La tira de membrana de celulosa es la región de la zona de prueba, sobre la cual se coloca una línea de prueba, que comprende anticuerpos monoclonales o policlonales rayados para capturar el conjugado de detección y una línea de control, que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control, tal como IgG, e indica al usuario que la prueba se ejecutó con éxito. El inmunoensayo de flujo lateral comprende además un soporte de película de poliéster unido a la tira de membrana de celulosa y un soporte de película laminada sensible a la presión. Cada inmunoensayo de flujo lateral se puede empaquetar en una bolsa MYLAR de barrera de vapor cero, por ejemplo.

40 Cuando se aplica una muestra de prueba a la almohadilla de muestra, la muestra migra desde la almohadilla de muestra a través de la almohadilla de conjugado de partículas, donde cualquier analito diana presente se unirá al conjugado de anticuerpo de detección. Luego, la muestra continúa migrando a través de la membrana hasta que alcanza la línea de prueba donde el complejo diana/conjugado se unirá a los anticuerpos inmovilizados produciendo una línea visible en la membrana. La muestra migra más a lo largo de la tira de membrana hasta que alcanza la línea de control, donde el exceso de conjugado de anticuerpos que no se unió a la línea de prueba se unirá a la línea de control y producirá una segunda línea visible en la membrana. El ligando de la línea de control es a menudo un anticuerpo contra la región Fc del anticuerpo conjugado. Esta línea de control indica que la muestra ha migrado a través de la membrana según lo previsto.

45 Un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral puede comprender una sola tira de membrana para la detección de un solo analito. El inmunoensayo de flujo lateral puede detectar dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) analitos. Cuando el inmunoensayo de flujo lateral detecta dos o más analitos, la prueba se puede configurar con múltiples

50 líneas de prueba dispuestas en serie en una sola tira de membrana.

El inmunoensayo de flujo lateral se puede configurar para probar dos

analitos en un solo casete de prueba en paralelo. El inmunoensayo de flujo lateral

puede comprender dos puertos para instilar las muestras de prueba. El inmunoensayo de flujo lateral puede comprender un puerto para instilar la muestra.

El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral se puede configurar para probar

tres analitos en un solo casete de prueba en paralelo. El inmunoensayo de flujo lateral

puede comprender tres puertos para instilar la muestra de prueba. El inmunoensayo de flujo lateral puede comprender un puerto para instilar la muestra de prueba.

5 El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral se puede configurar para

probar múltiples analitos en un solo casete de prueba en serie, por ejemplo, un casete de prueba que comprende una tira de membrana con dos líneas de prueba y una línea de control dispuestas en serie o un casete de prueba que comprende una tira de membrana con tres líneas de prueba y una línea de control dispuestas en serie.

10 El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral descrito actualmente puede proporcionar una detección cualitativa y/o cuantitativa de los marcadores diana. Cualitativamente, dos líneas claras en la membrana pueden representar un resultado positivo, mientras que una sola línea en la zona de control puede representar un resultado negativo. Cuantitativamente, el nivel o la cantidad de los marcadores diana se puede determinar en muestras en base a la comparación con las curvas estándar desarrolladas individualmente para cada diana y ejecutadas antes del ensayo de la muestra de prueba.

15 El anticuerpo de detección puede comprender un marcador que proporciona una señal

que puede ser leída visualmente por un médico o electrónicamente a través de un lector comercial o electrónicamente a través de una matriz de lectores internos en una placa de circuito impreso instalada dentro de un casete de ensayo de flujo lateral. Diversos marcadores son apropiados para su uso en los ensayos descritos instantáneamente. El marcador puede ser de oro coloidal.

20 Un experto en la técnica apreciará que diversos analitos de control son apropiados para su uso en los métodos de la presente invención para proporcionar verificación de que el ensayo se completó con éxito. El analito de control puede ser IgG.

25 Puede ser deseable tener un inmunoensayo de flujo lateral que pueda detectar más proteína del complemento en un único ensayo. Por ejemplo, un inmunoensayo de flujo lateral dual que puede detectar cualitativa y cuantitativamente más de una proteína del complemento en la misma alícuota de un fluido corporal puede ser muy deseable.

30 Se pueden incluir líneas de prueba adicionales que comprenden anticuerpos que se unen a proteínas MAC del complemento, que pueden ser el complemento C5b, el complemento C6, el complemento C7, el complemento C8 y/o el complemento C9. Dicho ensayo de flujo lateral puede comprender anticuerpos contra el complemento C3, el complemento C5b, el complemento C6, el complemento C7, el complemento C8, el complemento C9 y/o el complemento FB en cualquier combinación y en cualquier orden de primeros anticuerpos, segundos anticuerpos, terceros anticuerpos, etc. en la configuración apropiada como sería conocido para un experto en la técnica.

35 Existe una amplia variedad de marcadores que se pueden usar con una unidad estructural de unión (anticuerpo o antígeno) para formar un reactivo marcado. La elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con la unidad estructural de unión, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las disposiciones de eliminación. Los marcadores pueden ser solubles o

40 en partículas, metálicas, orgánicas o inorgánicas, y pueden incluir marcadores espectrales tales como proteína verde fluorescente, tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, biotina, avidina y estreptavidina), compuestos quimioluminiscentes. (por ejemplo, luciferina y luminol); y enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), marcadores colorimétricos espectrales tales como oro coloidal o partículas de carbono, o cuentas de plástico o vidrio coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

45 El marcador se puede acoplar directa o indirectamente a un componente de la unidad estructural de unión según los métodos bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos Nos. 4,863,875 y 4,373,932. Los marcadores no radiactivos se unen a menudo por medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) está unida covalentemente a la unidad estructural de unión. A continuación, el ligando se une a una molécula de antiligando (por ejemplo, estreptavidina) que es ya sea inherentemente detectable o está unida covalentemente a un sistema de señal tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. El marcador se puede unir a la unidad estructural de unión mediante un enlazante químico. Los dominios enlazantes son por lo general secuencias polipeptídicas, tales como secuencias poli-gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Los enlazantes preferidos son a menudo subsecuencias de aminoácidos flexibles. Tales enlazantes flexibles son conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, el poli (etilenglicol) está disponible comercialmente (Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Ala.). La unidad estructural de detección también se puede conjugar directamente con el compuesto generador de señal, por ejemplo, junto con una enzima o fluoróforo.

La presencia de un marcador se puede detectar mediante inspección o mediante un detector que supervisa una sonda particular o una combinación de sonda. Los detectores típicos incluyen espectrofotómetros, fototubos y fotodiodos, microscopios, contadores de centelleo, cámaras, películas y similares, así como combinaciones de los mismos. Los ejemplos de detectores apropiados están ampliamente disponibles en una variedad de fuentes comerciales conocidas para los expertos en la técnica.

Para los propósitos de la presente invención, los marcadores preferidos no son radiactivos y se detectan fácilmente sin el uso de instrumentación sofisticada. Preferiblemente, los marcadores producirán una señal visible que se puede discernir inmediatamente tras una inspección visual o mediante detección de fluorescencia. Los marcadores preferidos incluyen aquellos que se pueden observar como: 1) quimioluminiscencia (usando peroxidasa de rábano picante y/o fosfatasa alcalina con sustratos que producen fotones como productos de degradación); 2) cambio de color (oro coloidal, que produce un precipitado coloreado con el evento inmunorreactivo) y 3) fluorescencia (usando, por ejemplo, fluoresceína y otras etiquetas fluorescentes). De manera adecuada, se puede usar oro coloidal como el marcador y el marcador se conjuga directamente con la unidad estructural

de unión (el anticuerpo o antígeno). Cuando se usa oro como marcador, la reacción del complejo de reactivo-analito marcado con el reactivo de captura da como resultado la aparición de un depósito de color rojo. Como apreciará un experto en la técnica, el color que aparece tras la reacción del complejo con el reactivo de captura inmovilizado en la zona de captura dependerá del marcador usado.

Los reactivos de captura de

control y captura se inmovilizan sobre un sustrato sólido. Existen una variedad de soportes sólidos conocidos en la técnica, que son apropiados para su uso con la presente invención. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser perlas, membranas (por ejemplo, nitrocelulosa). Pozos de microtitulación (por ejemplo, PVC o poliestireno), hilos, tiras de plástico o cualquier superficie sobre la que puedan depositarse o inmovilizarse anticuerpos. Además, se puede emplear una amplia variedad de polímeros orgánicos e inorgánicos, tanto naturales como sintéticos, como material para la superficie sólida. Los polímeros ilustrativos incluyen polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), rayón, nailon, poli(butirato de vinilo), difluoruro de polivinilideno (PVDF), siliconas, poliformaldehído, celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa, y similares. Otros materiales que se pueden emplear incluyen papel, vidrios, cerámicas, metales, metaloides, materiales semiconductores, cementos o similares. Además, se pueden usar sustancias que forman geles, tales como proteínas (por ejemplo, gelatinas), lipopolisacáridos, silicatos, agarosa y poli(acrilamidas). También son apropiados los polímeros que forman varias fases acuosas, tales como dextranos y polialquilenglicoles o surfactantes, tales como fosfolípidos o sales de alquilamonio de cadena larga (12-24 átomos de carbono) y similares.

La manera de unir una amplia variedad de compuestos a diversas superficies es bien conocida y está ampliamente ilustrada en la bibliografía. Véase, por ejemplo, IMMOBILIZED ENZYMES, Ichiro Chibata, Halsted Press, New York, 1978, and Cuatrecasas, 1970.

Los reactivos de captura y control se pueden unir covalentemente o unirse de forma no covalente a través de enlaces inespecíficos. Si se desea una unión covalente entre un compuesto y la superficie, la superficie será normalmente polifuncional o podrá ser polifuncionalizada. Los grupos funcionales que pueden estar presentes en la superficie y usarse para la unión pueden incluir ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etilénicos, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. Además de la unión covalente, se pueden usar diversos métodos para la unión no covalente de un componente de ensayo. La unión no covalente es por lo general la absorción inespecífica de un compuesto a la superficie. Por lo general, la superficie se bloquea con un segundo compuesto para evitar la unión inespecífica de los componentes del ensayo marcados.

Los reactivos de captura y control se pueden absorber de forma inespecífica en una membrana de nitrocelulosa y bloquearse con una solución reguladora de bloqueo (por ejemplo, 0.5 % de BAS; 4 % de sacarosa en PBS).

Definiciones

Como se usa en este documento, "un", "una" y "el" pueden significar uno o más de uno, dependiendo del contexto en el que se use. Por ejemplo, "una" célula puede significar una célula o varias células.

También como se usa en este documento, "y/o" se refiere y abarca todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

Adicionalmente, el término "aproximadamente", como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible, tal como una cantidad de un compuesto o agente de esta invención, dosis, tiempo, temperatura y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$ o incluso $\pm 0.1\%$ de la cantidad especificada.

Un "sujeto" de esta invención incluye, pero no se limita a, cualquier animal que sea susceptible a la meningitis, incluidos, por ejemplo, humanos, primates no humanos, caballos, vacas, gatos, perros, cerdos, ratas y ratones. La

administración de las diversas composiciones de esta invención se puede realizar mediante cualquiera de varias vías diferentes. Las

composiciones pueden ser para administración por vía intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intranasal, intracraneal, sublingual, intravaginal, intrarectal, oral o tópica. Las composiciones en este documento pueden ser para la administración mediante un método de escarificación cutánea o por vía transdérmica mediante un parche o líquido. Las composiciones se pueden administrar por vía subdérmica en forma de un material biodegradable que libera las composiciones durante un periodo de tiempo.

"Meningitis bacteriana" significa meningitis (esto es, inflamación de las meninges) causada por una especie bacteriana que incluye pero no se limita a *Streptococcus sp.*, *Escherichia sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Listeria sp.*, *Neisseria sp.*, *Salmonella sp.*, *Haemophilus sp.*, y otras bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Cuando las bacterias no causan la inflamación o si el organismo bacteriano no se puede cultivar e identificar en el laboratorio, se denomina "meningitis aséptica". De este modo, la meningitis aséptica se debe por lo general a la infección por agentes de otras bacterias como, que pueden ser, por ejemplo, virus Coxsackie, virus eco, adenovirus, enterovirus, virus del herpes, virus de las paperas, virus de la rabia, otros virus no especificados, infección criptocócica o infección por otros organismos fúngicos e infección por parásitos. La meningitis aséptica, también conocida como meningitis estéril, también se ha asociado, en algunos casos, con enfermedades autoinmunes, cáncer, enfermedad de Lyme o una reacción adversa a medicamentos. La meningitis también puede ser causada por especies micobacterianas y se considera que es meningitis aséptica.

Los síntomas de meningitis bacteriana y meningitis aséptica en adultos son similares y pueden incluir, pero no se limitan a, fiebre, dolor de cabeza, rigidez de cuello, disminución de la conciencia, convulsiones, sensibilidad y/o dolor ocular, erupción cutánea, mareos y vómitos. En los bebés, los signos de la meningitis pueden ser fiebre, irritabilidad difícil de calmar, disminución del apetito, sarpullido, vómitos y llanto agudo. Los bebés también pueden tener un cuerpo rígido y puntos blandos abultados en la cabeza que no son causados por el llanto. Los bebés con meningitis pueden llorar cuando se los manipula. Los niños pequeños con meningitis pueden actuar como si tuvieran gripe (influenza), tos o dificultad para respirar. Los adultos mayores y las personas con otras afecciones médicas pueden tener solo un ligero dolor de cabeza y fiebre. Es posible que no se sientan bien y que tengan poca energía.

De este modo, un "sujeto que lo necesita" como se describe en este documento es un sujeto que tiene síntomas de meningitis y/o ha sido diagnosticado con meningitis y/o se sospecha que tiene meningitis y/o ha estado expuesto o ha tenido contacto con otros sujetos con síntomas de meningitis y/o han sido diagnosticados y/o se sospecha que tienen meningitis.

El término "analito" significa cualquier entidad, particularmente una entidad química, bioquímica o biológica que se va a evaluar, por ejemplo, cuya cantidad (por ejemplo, concentración o masa), actividad, composición u otra (s) propiedad (es) es/son detectada (s), medida (s), cuantificada (s), evaluada (s), analizada (s), etc. Un "analito" puede ser una sola especie molecular o puede estar compuesto de múltiples especies moleculares distintas.

El término "anticuerpo" abarca inmunoglobulinas intactas y/o de longitud completa de tipos IgA, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM, IgY, fragmentos de unión a antígeno o cadenas sencillas de inmunoglobulinas completas (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos FD, sscFv (variable monocatenaria) y fragmentos dAb) y otras proteínas que incluyen al menos una región variable de inmunoglobulina de unión a antígeno, por ejemplo, una proteína que comprende una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una región variable de cadena pesada (H) (VH) y una región variable de cadena ligera (L) (VL). Las cadenas ligeras de un anticuerpo pueden ser de tipo kappa o lambda. Un anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Un anticuerpo policlonal contiene moléculas de inmunoglobulina que difieren en la secuencia de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) y, por lo tanto, reconocen por lo general diferentes epítopos de un antígeno. A menudo, un anticuerpo policlonal se deriva de múltiples líneas de células B diferentes, cada una de las cuales produce un anticuerpo con una especificidad diferente. Un anticuerpo policlonal puede estar compuesto en gran parte por varias subpoblaciones de anticuerpos, cada una de las cuales se deriva de una línea de células B individual. Un anticuerpo monoclonal está compuesto por moléculas de inmunoglobulina individuales que comprenden CDR con la misma secuencia y, por lo tanto, reconocen el mismo epítipo (esto es, el anticuerpo es monoespecífico). A menudo, un anticuerpo monoclonal se deriva de una única línea de células B o hibridoma. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo "humanizado" en el que, por ejemplo, un dominio variable de origen roedor se fusiona con un dominio constante de origen humano o en el que algunos o todos los aminoácidos de la región determinante de la complementariedad a menudo junto con uno o más aminoácidos de marco se "injertan" de un roedor, por ejemplo, un anticuerpo murino, a un anticuerpo humano, conservando de este modo la especificidad del anticuerpo de roedor.

"Fluido corporal" significa cualquier fluido en el cuerpo que se pueda analizar para detectar la presencia de proteínas del complemento. Los fluidos corporales incluyen, pero no se limitan a, sangre completa, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de heridas, líquido de lavado bronquealveolar y líquido cefalorraquídeo (CSF).

"Control" se refiere a una muestra que tiene una cantidad o nivel conocido de una proteína del complemento. El control puede tener un nivel de proteína del complemento comparable al de un individuo que no tiene meningitis bacteriana,

de modo que una muestra de prueba que tiene un nivel de proteína del complemento que está aumentado en comparación con el control es indicativa de meningitis bacteriana.

"Epítipo" se refiere a la porción mínima de una molécula que es reconocida por, y de este modo determina la inmunoespecificidad de, un anticuerpo que se une a tal epítipo. El término también se usa en este documento para referirse a la porción mínima de una molécula que es reconocida por un agente de unión no específico de anticuerpo.

"Marcador" se refiere a una unidad estructural detectable que facilita la detección directa o indirecta y/o la medición cuantitativa o relativa de una molécula a la que está unido. Un marcador detectable o una fracción detectable a menudo produce una señal tal como fluorescencia, quimioluminiscencia, radioactividad, color, propiedades magnéticas o paramagnéticas, etc., que la hace detectable, por ejemplo, mediante el uso de instrumentos que detectan fluorescencia, quimioluminiscencia, radioactividad, color, etc. campo magnético, resonancia magnética, etc., o en algunos casos mediante inspección visual. El marcador puede ser, por ejemplo, una sustancia fluorescente; pigmento; sustancia quimioluminiscente o luminiscente; sustancia coloreada; sustancia magnética; o una partícula de metal no magnética como el coloide de oro. De manera adecuada, los anticuerpos de detección

apropiados para su uso en los métodos y ensayos actuales pueden conjugarse con un marcador de oro coloidal, que proporciona una señal de color.

"Neoepítipo" se refiere a un epítipo que se genera o se vuelve detectable como resultado de la escisión proteolítica de un componente del complemento o producto de escisión.

De manera adecuada, el complemento

presente en la muestra de fluido corporal analizada puede no ser sustancialmente activado por el ensayo o método en sí. "No sustancialmente activado", como se usa en el contexto, significa que los métodos y ensayos de la presente invención están sustancialmente libres de activación *in vitro* causada por los métodos y/o materiales de prueba. De esta forma se evitan los resultados falsos positivos de la prueba, ya que el inmunoensayo de flujo lateral es rápido y requiere menos manipulación de la muestra, evitando de este modo muchos de los estímulos que contribuyen a la activación del complemento *in vitro*.

"Punto de atención", como se usa en este documento, se refiere a un dispositivo o método que se puede usar o llevar a cabo junto a la cama, en el consultorio de un médico, en un centro de atención médica o de tratamiento o en cualquier lugar donde una muestra pueda ser obtenido de un sujeto a ser probado. Las pruebas en el lugar de atención generalmente no requieren el envío de una muestra a un laboratorio para su procesamiento o la experiencia de un técnico de laboratorio capacitado. Los métodos y las pruebas en el punto de atención que se describen en este documento permiten que un médico reciba información crítica junto a la cama del paciente o en el lugar de la evaluación o el tratamiento, lo que puede dirigir la atención al paciente de manera más eficiente y eficaz.

"Lector" se refiere a un instrumento apropiado para la detección de la señal producida por el marcador. Se conocen en la técnica varios instrumentos para la detección de señales de marcaje en pruebas de diagnóstico. De manera adecuada, el marcador puede ser oro coloidal y el lector es un instrumento apropiado para la detección cualitativa y/o cuantitativa de la señal de color producida por el marcador. Los lectores apropiados están disponibles comercialmente de una variedad de proveedores, incluidos BioAssay Works (IJamesville, Md.) the ESE-Quant de Qiagen (Hilden, German), Easterline LRE (Nordlingen, Germany), y Detekt Biomedical (Austin, Tex.). De manera adecuada, el lector puede ser un lector de mano que cuantifica la cantidad o concentración de la (s) proteína (s) del complemento que se evalúan.

Como se usa en este documento, la recolección "en serie" de muestras se refiere a tomar una muestra separada (por ejemplo, una muestra de CSF) de un sujeto durante un periodo de tiempo, por ejemplo, minutos, horas, días, semanas, meses, etc.)

Como se usa en este documento, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una composición o formulación de esta invención que es suficiente para producir un efecto deseado, que puede ser un efecto terapéutico. La cantidad eficaz variará con la edad, el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el agente en particular, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente, el portador farmacéuticamente aceptable usado y factores similares dentro el conocimiento y la experiencia de los expertos en la técnica. Según sea apropiado, una "cantidad eficaz" en cualquier caso individual puede ser determinada para un experto en la técnica por referencia a los textos y la literatura pertinentes y/o usando experimentación de rutina. (Véase, por ejemplo, Remington, The Science And Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)).

La eficacia de los métodos de tratamiento descritos en este documento se puede determinar según protocolos bien conocidos para determinar el resultado de un tratamiento de una enfermedad o infección de esta invención. Los determinantes de la eficacia del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad, mejora de los síntomas, tiempo de progresión y/o calidad de vida, etc., como son bien conocidos en la técnica.

"Tratar" o "que trata" o "tratamiento" se refiere a cualquier tipo de acción que imparte un efecto modulador, que, por ejemplo, puede ser un efecto beneficioso, a un sujeto que padece un trastorno, enfermedad o dolencia, incluyendo mejora en la condición del sujeto (por ejemplo, en uno o más síntomas), retraso o reducción en la progresión de la afección, retraso en la aparición del trastorno, enfermedad o dolencia, y/o cambio en cualquiera de los parámetros clínicos de un trastorno, enfermedad o dolencia, etc., como sería bien conocido en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1. C3 y factor B (FB) como biomarcadores de meningitis bacteriana

La meningitis bacteriana se caracteriza por una alta mortalidad y una alta tasa de deterioro neurológico persistente. El diagnóstico etiológico rápido es fundamental para el manejo clínico apropiado de los pacientes con meningitis bacteriana. Desafortunadamente, los síntomas clínicos inespecíficos y los primeros hallazgos de laboratorio a menudo no diferencian de manera inequívoca entre meningitis bacteriana y aséptica. Por lo tanto, la identificación de un único parámetro discriminatorio sería de gran valor en el diagnóstico diferencial de la meningitis aguda.

En este documento se describe un método de diagnóstico de meningitis bacteriana frente a meningitis aséptica en base a cambios en los niveles de líquido cefalorraquídeo (CSF) de proteínas específicas del complemento, que incluyen, pero no se limitan a, C3, factor B (FB), MAC, C5b, C6, C7, C8 y C9 en comparación con los niveles normales de CSF. Esto se basa en el descubrimiento de que el nivel en el CSF de muchas proteínas del complemento, que normalmente es bajo (intervalo de nanogramos a microgramos), aumenta de uno a dos órdenes de magnitud o más en la meningitis bacteriana, pero no aséptica o inducida por virus. Este aumento permite una fácil discriminación entre meningitis bacteriana y aséptica usando una variedad de plataformas de ya sea ensayo cuantitativo o semicuantitativo tal como el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), ensayos de flujo lateral o multiplex, etc.

Actualmente no existe un ensayo de punto de atención (POC) económico disponible para discriminar rápida y exactamente entre meningitis bacteriana y aséptica. El sistema de ensayo rápido incorporado en esta invención se podría usar en entornos clínicos en los que se extrajo CSF en base a la sospecha de meningitis bacteriana. En dicha plataforma, el ensayo se utilizaría entre 1-2 millones de veces al año en los Estados Unidos, con mercados de tamaño comparable en Europa y Asia para fines de diagnóstico.

Se realizó ELISA para C3 y FB en muestras de CSF remanentes obtenidas de pacientes con meningitis bacteriana o viral confirmada. Se encontró que ambas proteínas estaban significativamente elevadas en la meningitis bacteriana en comparación con la meningitis viral y los controles (Figura

2 y Tabla 2).

Los niveles en CSF en pacientes con meningitis bacteriana fueron 21 veces más altos que los de meningitis aséptica y casi 19 veces más altos que los controles. Los niveles de factor B en CSF en la meningitis bacteriana fueron incluso más elevados: 63 veces en comparación con la meningitis aséptica y 53 veces en comparación con los controles. El análisis de regresión lineal que compara los niveles en CSF emparejados de C3 y FB en la meningitis bacteriana demostró una correlación significativa entre las dos proteínas ($r^2 = 0.33$, $p = 0.008$), lo que sugiere fuertemente mecanismo (s) inflamatorio (s) común (es) que conduce (n) a sus aumentos, además, ambas proteínas discriminaban entre meningitis bacteriana y viral con una sensibilidad y especificidad extremadamente altas (Tabla 2).

Actualmente, la discriminación entre meningitis bacteriana y aséptica es costosa y requiere mucho tiempo. La tinción de Gram, la bioquímica y el cultivo bacteriano, que actualmente son las únicas pruebas para diagnosticar la meningitis bacteriana, tardan horas o días en completarse y tienen tasas significativas de falsos positivos. El repertorio actual de pruebas de laboratorio que se usan para diagnosticar la meningitis bacteriana cuesta al menos \$ 1000. De manera adecuada, un ensayo de flujo lateral POC implicaría aproximadamente de 10-15 minutos y costaría, por ejemplo, alrededor de \$ 100. Esto proporciona un importante ahorro de tiempo y costes. Dicho ensayo de POC se podría usar, por ejemplo, en salas de emergencia y clínicas independientes o instalaciones sanitarias de todo el mundo.

Ejemplo 2. C9 como biomarcador de meningitis bacteriana

Una parte separada, pero integral del aclaramiento de patógenos, la vía del complemento terminal incluye muchas proteínas diferentes. Uno de estas, C9, es fundamental para la formación del complejo de unión a la membrana (MAC), un gran complejo formador de poros capaz de lisar patógenos del huésped, incluidas muchas bacterias y virus envueltos. El MAC está compuesto por cinco proteínas del complemento, C5b, C6, C7, C8 y múltiples moléculas C9 (que varían de 12-18 por MAC). Las moléculas C9 en el MAC forman la estructura de poros real que se inserta en las membranas bacterianas dando como resultado su lisis osmótica.

C9 es distinta de C3 y FB como un biomarcador de meningitis bacteriana porque su función no está relacionada ni es independiente de ambas proteínas.

C9 es una proteína de fase aguda; esto es, su producción aumenta en respuesta a la inflamación debida a un traumatismo o una infección. Se ha demostrado que C9 se transporta a través de la barrera hematoencefálica a niveles bajos en ausencia de infección. Este procedimiento probablemente aumenta significativamente durante la meningitis

bacteriana como resultado de la inflamación mediada por citocinas que debilita la barrera hematoencefálica. La producción de C9 por varios tipos de células en el sistema nervioso central aumenta en respuesta a la inflamación y la infección.

5 A diferencia de C3 y el factor B, muchas infecciones virales conducen a una regulación a la baja de la producción de C9, que es una estrategia usada por algunos virus para limitar las funciones de defensa del huésped mediadas por el complemento. Esto aumenta la relevancia de C9 como un biomarcador para la meningitis bacteriana, ya que es menos probable que los niveles de C9 aumenten en infecciones virales, lo que debería mejorar la especificidad y sensibilidad de los ensayos de la presente invención.

10 Estas características únicas de la inmunobiología de C9, cuando se combinan con la capacidad de C3 y la fábrica B para discriminar la meningitis bacteriana de la aséptica, proporcionan un ensayo de diagnóstico con sensibilidad aditiva y/o sinérgica.

De este modo, se puede obtener una muestra de CSF de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que lo necesite) y analizar para determinar una cantidad de C9 según los métodos y ensayos descritos en este documento.

Ejemplo 3. MAC como biomarcador de meningitis bacteriana

15 Una parte separada, pero integral del aclaramiento de patógenos, la vía del complemento terminal incluye muchas proteínas diferentes. Uno de ellos, MAC es un gran complejo formador de poros capaz de lisar patógenos del huésped, incluidas muchas bacterias y virus envueltos. El MAC está compuesto por cinco proteínas del complemento, C5b, C6, C7, C8 y múltiples moléculas C9 (que varían desde 12-18 por MAC). Las moléculas C9 en el MAC forman la estructura de poros real que se inserta en las membranas bacterianas dando como resultado su lisis osmótica.

20 El MAC es distinto de C3 y FB como un biomarcador para la meningitis bacteriana porque su función no está relacionada ni es independiente de ambas proteínas.

Los componentes de MAC son proteínas de fase aguda; esto es, su producción aumenta en respuesta a la inflamación debida a un traumatismo o una infección. La producción de subcomponentes MAC por varios tipos de células en el sistema nervioso central y otros tipos de células aumenta en respuesta a la inflamación y la infección.

25 Estas características únicas de la inmunobiología de MAC por sí solas le permiten discriminar la meningitis bacteriana de la aséptica para proporcionar un ensayo de diagnóstico. Además, cuando se combina con la capacidad de otros componentes del complemento, tal como C3, para discriminar la meningitis bacteriana de la aséptica, proporciona un ensayo de diagnóstico con sensibilidad aditiva y/o sinérgica.

30 De este modo, se puede obtener una muestra de CSF de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que lo necesite) y analizar para determinar una cantidad de MAC (por ejemplo, C5, C6, C6, C8 y/o C9) según los métodos y ensayos descritos en este documento.

Ejemplo 4.

La presente invención proporciona un método de identificación

35 de infección bacteriana en sujetos con derivaciones permanentes o dispositivos extraventriculares (EVD) en base a cambios en los niveles de líquido cefalorraquídeo (CSF) de proteínas específicas del complemento, incluyendo C5b-9 (MAC) en comparación con los niveles en CSF del control. Esto se basa en la observación de que el nivel en el CSF de muchas proteínas del complemento que normalmente son bajas (intervalo de nanogramos a microgramos), puede aumentar varios órdenes de magnitud en el CSF de una infección bacteriana confirmada. Este aumento espectacular permite una determinación rápida de la infección de la derivación/EVD/meningitis usando una variedad de plataformas de ya sea ensayo cuantitativo o semicuantitativo tal como ELISA, ensayos de flujo lateral o multiplex. Actualmente no existe un ensayo de punto de atención (POC) de bajo coste disponible para diagnosticar de manera rápida y precisa una infección de la derivación/EVD.

45 Tras la aplicación de la invención de un sistema de ensayo rápido, el ensayo se podría usar en cualquier entorno clínico en el que se extrajo CSF en base a la sospecha de infección de la derivación/EVD. En dicha plataforma, el ensayo se usaría ~ 1 millón de veces al año en los EE. UU., con mercados de tamaño comparable en Europa y Asia con fines de diagnóstico.

50 Se realizó ELISA para MAC en muestras de CSF obtenidas de sujetos de neurocirugía pediátrica con derivaciones o EVD bajo sospecha de infección bacteriana. Se encontró que los niveles de MAC estaban marcadamente regulados al alza en sujetos con infección bacteriana confirmada en comparación con aquellos sin infección (sujetos de control) (Figuras 3 y 5, Tabla 3). Los niveles medios de MAC en CSF en la primera extracción de CSF en pacientes con infecciones de la derivación/EVD (n = 3) fueron 100 veces más altos que aquellos sin infección (n = 24). Estos datos indicaron que la MAC y potencialmente otras proteínas del complemento o fragmentos de activación tienen un potencial significativo como marcadores de diagnóstico para la infección de la derivación/EVD.

En la actualidad, el diagnóstico de infecciones de la derivación/EVD lleva mucho tiempo y es costoso. La tinción de Gram, la bioquímica y el cultivo bacteriano, que actualmente son las únicas pruebas para diagnosticar la meningitis bacteriana, tardan horas o días en completarse y tienen tasas significativas de falsos positivos. El repertorio actual de pruebas de laboratorio que se usan para determinar si el CSF está infectado cuesta al menos \$ 1,000. De manera adecuada, el empleo de un ensayo de flujo lateral POC

sería rápido (por ejemplo, los resultados de la prueba podrían estar disponibles en aproximadamente 10-15 minutos y a bajo coste (por ejemplo, alrededor de \$ 100). Esto proporciona un ahorro significativo de tiempo y coste para el paciente. Además, un ensayo de biomarcadores POC permitiría un mejor manejo del paciente.

Una vez aplicada la invención a un método de ensayo rápido POC, tendría un potencial de mercado significativo. Se podría usar en quirófanos y clínicas de todo el mundo.

Ejemplo 5.

Para determinar el valor de la monitorización repetida de CSF de pacientes con infección de la derivación confirmada, analizamos los niveles de MAC en CSF en diversos puntos de tiempo después de la toma inicial durante hasta quince días. El nivel de MAC en CSF en la toma inicial fue superior a 400 veces el nivel normal observado en pacientes no infectados (Figura 4). Se instituyó la terapia con antibióticos por vía intravenosa y se hicieron tomas repetidas veces al paciente para seguir la efectividad del tratamiento con antibióticos. Los niveles de MAC en CSF disminuyen con el tiempo a medida que el paciente mejora y la infección desaparece. Estos datos indican que seguir el nivel de MAC en CSF, y posiblemente otros componentes de activación del complemento, puede ser clínicamente útil para monitorear la efectividad de antibióticos y otras modalidades de tratamiento en infecciones de la derivación.

Ejemplo 6. MAC y C3 como indicadores de falla de la derivación

La presente invención puede proporcionar un método de

discriminación del fallo de la derivación (agrandamiento ventricular sintomático, SVE) de la infección bacteriana y/o agrandamiento ventricular asintomático (AVE) en sujetos con shunt permanentes o dispositivos extraventriculares (EVD) en base a cambios en los niveles de líquido cefalorraquídeo (CSF) de proteínas específicas del complemento, que incluyen, C5b-9 (MAC)

en comparación con los niveles en CSF del control. Esto se basa en la observación

de que el nivel en CSF de muchas proteínas del complemento que normalmente son bajas (intervalo de nanogramos), puede aumentar de 8-10 veces en pacientes con SVE en comparación con aquellos con AVE, pero varios órdenes de magnitud más bajos que en CSF de infección bacteriana confirmada. Esta gama distinta de niveles de complemento permite una determinación rápida de fallas de la derivación/EVD versus infección/meningitis usando una variedad de plataformas de ensayo cuantitativo o semicuantitativo tal como ELISA, ensayos de flujo lateral o multiplex. Actualmente, no existe un ensayo de punto de atención (POC) de bajo coste disponible para diagnosticar de manera rápida y precisa una falla de la derivación.

Tras la aplicación de la invención a un sistema de ensayo rápido, el ensayo se podría usar en cualquier entorno clínico en el que se extrajo CSF en base a la sospecha de falla de la derivación. En una plataforma de este tipo, el ensayo se usaría ~ 1 millón de veces al año en los EE. UU., con mercados de tamaño comparable en Europa y Asia con fines de diagnóstico.

Se realizó ELISA para MAC en muestras de CSF obtenidas de sujetos de neurocirugía pediátrica con derivaciones o EVD bajo sospecha de falla de la derivación o infección bacteriana. Se encontró que los niveles de MAC eran marcadamente más bajos en sujetos con falla confirmada de la derivación en comparación con aquellos con infección bacteriana (Figura 6). Los niveles medios de MAC en CSF en pacientes con falla de la derivación (n = 35) fueron 8-10 veces más altos que aquellos con AVE pero 30-40 veces más bajos que los pacientes con infección bacteriana (n = 6). Estos datos indicaron que el MAC tiene un potencial significativo como marcadores de diagnóstico de fallas de la derivación. De manera similar, se realizaron ELISA para C3 en muestras de CSF obtenidas de sujetos de neurocirugía pediátrica con derivaciones o EVD bajo sospecha de falla de la derivación o infección bacteriana. Se encontró que los niveles de C3 eran significativamente más bajos en sujetos con falla confirmada de la derivación en comparación con aquellos con infección bacteriana (Figura 7). Los niveles medios de C3 en CSF en el CSF en pacientes con falla de la derivación (n = 13) fueron 2 veces más altos que aquellos con AVE pero 3 veces más bajos que los pacientes con infección bacteriana (n = 3). Estos datos indicaron que el C3 tiene un potencial significativo como marcadores de diagnóstico de fallas de la derivación.

Actualmente, el diagnóstico de fallos de la derivación requiere mucho tiempo y es costoso. La tinción de Gram, la bioquímica y el cultivo bacteriano, para determinar si el paciente tiene una infección de bajo grado en lugar de falla de la derivación, demora horas o días en completarse y tiene tasas significativas de falsos positivos. El repertorio actual de pruebas de laboratorio que se usan para determinar si el CSF está infectado cuesta al menos \$ 1,000. Los pacientes con sospecha de falla de la derivación también se someten a costosos estudios de imagen para determinar si hay una

característica de agrandamiento ventricular o falla de la derivación. De manera adecuada, el empleo de un ensayo de flujo lateral POC sería

5 rápido (por ejemplo, los resultados de la prueba podrían estar disponibles en aproximadamente 1 a 15 minutos y con un coste bajo (por ejemplo, alrededor de \$ 100). Esto proporciona un ahorro significativo de tiempo y coste para el paciente. Además, un ensayo de biomarcador POC permitiría un mejor manejo del paciente.

La invención, una vez aplicada a un método de ensayo rápido POC, tendría un potencial de mercado significativo. Se podría usar en quirófanos y clínicas de todo el mundo.

Tabla 1. Anticuerpos contra C3

Especies	Antígeno	Proveedor
ratón	C3a	Hycult (HM2075)
ratón	C3a	Quidel (A203)
pollo	C3a	GenTex (GTX78198)
ratón	C3a	Quidel (A203)
cabra	C3a	SantaCruz (sc17237)
ratón	C3a	Hycult (HM2073)
ratón	C3a	Hycult (HM2074)
pollo	C3a	Abcam (ab48580)
ratón	C3a	Hycult (HM2073)
ratón	C3a	Quidel (A203)
pollo	C3a	Abcam (ab48580)
ratón	C3a	Hycult (HM2073)
cabra	C3a	SantaCruz (sc17237)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)

(continuación)

Especies	Antígeno	Proveedor
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
pollo	C3a	Abcam (ab48580)
pollo	C3a	Abcam (ab48580)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
ratón	C3a	Quidel (A2103)
pollo	C3a	GenTex (GTX78198)
cabra	C3a	SantaCruz (sc17237)
pollo	C3a	Abcam (ab48580)
ratón	C3a	Hycult (HM2073)
ratón	C3a	Hycult (HM2074)
ratón	iC3b	Quidel (A209)
ratón	iC3b	AbD serotec (MCA2607)
ratón	iC3b	AbD serotec (MCA2607)
ratón	iC3b	Quidel (A209)
ratón	iC3b	Quidel (A209)
ratón	iC3b	Quidel (A209)
ratón	iC3b	Quidel (A209)
rata	iC3b	Hycult (HM2199)
rata	iC3b	Hycult (HM2199)
rata	iC3b	Hycult (HM2199)
rata	iC3b	Hycult (HM2199)
rata	iC3b	Hycult (HM2199)
ratón	C3 activo	Hycult (HM2168)
ratón	C3 activo	Hycult (HM2168)

(continuación)

Especies	Antígeno	Proveedor
ratón	C3 activo	Hycult (HM2257)
ratón	C3 activo	Hycult (HM2257)
ratón	C3 alfa	Meridian (H54189M)
ratón	neo C3d	Quidel (A250)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
conejo	C3d	Abcam (ab15981)
rata	C3d	Hycult (HM2198)
rata	C3g	Hycult (HM2199)
ratón	neo C3d	Quidel (A250)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
ratón	C3 activo	Hycult (HM2168)
ratón	C3 activo	Hycult (HM2257)
ratón	iC3b	Quidel (A209)
ratón	Neo C3d	Quidel (A250)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
rata	C3g	Hycult (HM 2199)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
rata	C3g	Hycult (HM 2199)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
rata	C3g	Hycult (HM 2199)
cabra	C3	MP Biomedicals (55237)
rata	C3g	Hycult (HM 2199)

Tabla 2. Parámetros estadísticos para C3 y factor B en meningitis bacteriana versus aséptica

	C3			Factor B		
	BM	AM	Controles	BM	AM	Controles
Media ± SE (mg/ml)	47 ± 10.8	2.2 ± 0.4	2.5 ± 0.3	15.7 ± 3.8	0.25 ± 0.04	0.3 ± 0.03
Sensibilidad	100 %			100 %		
Especificidad	95 %			100 %		
BM, meningitis bacteriana, AM, meningitis aséptica						

Tabla 3. Parámetros estadísticos de MAC en infecciones de la derivación/EVD

	Infecciones de la derivación	Controles
n	3	24
Media $\pm$ SEM (ng/ml)	1581 $\pm$ 1218	15.6 $\pm$ 5
Intervalo	270-4014	0-97

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* de identificación de uno cualquiera de los siguientes escenarios seleccionados del grupo que comprende:
 - (i) diferenciar la meningitis ya sea como meningitis bacteriana o meningitis aséptica en un sujeto que la necesite; y
 - (ii) diferenciar una infección por meningitis bacteriana asociada con una derivación permanente y/o un dispositivo extraventricular en un sujeto que lo necesite; comprendiendo el método medir la cantidad de: complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del sujeto:
 - a) en el que una cantidad de MAC del complemento medida que es mayor que una cantidad umbral de MAC del complemento identifica el escenario como se define en las partes (i) a (ii); o
 - b) comparar la cantidad de MAC del complemento medida en una muestra de control, en el que una cantidad de MAC del complemento medida en la muestra obtenida del sujeto que es mayor que una cantidad de MAC del complemento medida en la muestra de control identifica la meningitis bacteriana en el escenario como se define en las partes (i) a (ii).
2. Un método *ex vivo* para guiar un tratamiento para uno cualquiera de los siguientes escenarios seleccionados del grupo que comprende:
 - (i) meningitis bacteriana en un sujeto que lo necesite; y
 - (ii) una infección por meningitis bacteriana asociada con una derivación permanente y/o un dispositivo extraventricular en un sujeto que lo necesite;el método que comprende
 - a) medir la cantidad de MAC del complemento en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del sujeto antes de la administración de un tratamiento;
 - b) medir la cantidad de MAC del complemento en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del sujeto en uno o más puntos de tiempo después de dicho tratamiento;
 - c) orientar el tratamiento del sujeto para uno cualquiera de los escenarios (i) a (ii) usando la (s) medición (es) de (b) de modo que un aumento o ningún cambio en la (s) cantidad (es) medida (s) en (b) en relación con la (s) cantidad (es) medida (s) en (a) conduzca a una mejora posterior del tratamiento, y una disminución en la (s) cantidad (es) medida (s) en (b) en relación con la (s) cantidad (es) medida (s) en (a) no conduce a ningún cambio o una reducción posterior del tratamiento.
3. Un método *ex vivo* de identificación de un régimen de tratamiento para un sujeto con meningitis bacteriana mediante la diferenciación de una infección ya sea como meningitis bacteriana o meningitis aséptica, que comprende:
 - a) medir la cantidad de MAC del complemento en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del sujeto;
 - b) comparar la cantidad de MAC del complemento medida en (a) con la cantidad de MAC del complemento medida en una muestra de control,en el que una cantidad de MAC del complemento medida en (a) que es mayor que la cantidad de MAC del complemento medida en la muestra de control identifica la meningitis como meningitis bacteriana, identificando un régimen de tratamiento de hospitalización y terapia con antibióticos; y en el que una cantidad de MAC del complemento que es menor o igual que la cantidad de MAC del complemento en la muestra de control identifica meningitis aséptica, identificando un régimen de tratamiento sin hospitalización ni terapia con antibióticos.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad de complemento C9, factor B (FB) del complemento, complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8 y/o complemento C3 en un líquido cefalorraquídeo (CSF) también se mide.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que solo se mide la cantidad de un factor de complemento en la muestra de CSF.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que solo se mide la cantidad de dos factores del complemento en la muestra de CSF, siendo el par de factores del complemento el complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento y un factor del complemento seleccionado del grupo que comprende el complemento C9, factor B (FB) del complemento, complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8 y/o complemento C3.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la cantidad de tres factores de complemento se mide en la muestra de CSF, siendo la combinación de tres factores de MAC del complemento, factor B del complemento y complemento C3.
- 5 8. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la medición se lleva a cabo con una cualquiera de los siguientes ensayos seleccionados del grupo que comprende un sistema de ensayo rápido en el punto de atención (POC), un sistema de flujo lateral, un inmunoensayo y un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).
9. Una tira seca para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, la tira seca capaz de absorber un fluido aplicado a la misma por capilaridad dentro de la tira, comprendiendo dicha tira, en una dirección aguas arriba (en un primer extremo) a aguas abajo (en un segundo extremo) y en el siguiente orden:
- 10 1) una zona de aplicación de muestras,
- 2) una zona de reacción y
- 3) una zona de detección,
- en la que dicha zona de reacción comprende un primer anticuerpo marcado no inmovilizado específico contra un epítipo de una proteína en el MAC del complemento, que puede comprender el complemento C5b, C6, C7, C8 y/o C9, eficaz para formar con este, un complejo móvil de MAC del complemento/anticuerpo, y dicha zona de detección comprende un segundo anticuerpo inmovilizado específico contra un epítipo de un MAC del complemento en dicho complejo, en el que dicho primer y segundo anticuerpos son específicos para diferentes epítipos en la misma proteína en el MAC del complemento y en el que, después de la aplicación de una muestra de fluido corporal a la zona de aplicación de muestra en el primer extremo,
- 15 en la que dicha zona de reacción comprende un primer anticuerpo marcado no inmovilizado específico contra un epítipo de una proteína en el MAC del complemento, que puede comprender el complemento C5b, C6, C7, C8 y/o C9, eficaz para formar con este, un complejo móvil de MAC del complemento/anticuerpo, y dicha zona de detección comprende un segundo anticuerpo inmovilizado específico contra un epítipo de un MAC del complemento en dicho complejo, en el que dicho primer y segundo anticuerpos son específicos para diferentes epítipos en la misma proteína en el MAC del complemento y en el que, después de la aplicación de una muestra de fluido corporal a la zona de aplicación de muestra en el primer extremo,
- 20 (i) la muestra migra en una dirección aguas abajo en la tira hacia la zona de reacción,
- (ii) la proteína en el MAC del complemento de la muestra reacciona con el primer anticuerpo previamente presente en la zona de reacción para formar un complejo móvil de MAC del complemento/anticuerpo marcado,
- (iii) el complejo móvil de MAC del complemento/anticuerpo marcado migra hacia la zona de detección en el segundo extremo, y
- 25 (iv) el complejo móvil de MAC del complemento/anticuerpo marcado se une al segundo anticuerpo inmovilizado previamente presente en la zona de detección, inmovilizando así dicho complejo en la zona de detección.
10. Un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para detectar un marcador, que comprende: una tira de membrana; un anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo del marcador, en el que opcionalmente el anticuerpo de detección comprende un marcador que proporciona una señal; una línea de prueba que comprende un anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo del marcador; y una línea de control que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control, en el que el marcador es una proteína en el MAC del complemento, opcionalmente un marcador seleccionado del grupo que consiste en: proteína del complemento C9, factor B de la proteína del complemento, proteína del complemento C5b, proteína del complemento C6, proteína del complemento C7, proteína del complemento C8, proteína del complemento C3 y cualquier combinación de las mismas.
- 30 11. Un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende:
- 35 una tira de membrana; un primer anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en el MAC del complemento c;
- 40 una primera línea de prueba que comprende un primer anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la primera proteína; un segundo anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8, complemento C9, complemento C3 y factor B de la proteína del complemento, en donde dicha segunda proteína es diferente de dicha primera proteína;
- 45 una segunda línea de prueba que comprende un segundo anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la segunda proteína; y
- al menos una línea de control que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control.
12. El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 11, que comprende además un tercer anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una tercera proteína seleccionada del grupo que consiste en complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8, complemento C9, complemento C3 y factor B de la proteína del complemento, en el que dicha tercera proteína es diferente de dicha primera proteína y dicha
- 50

segunda proteína, y una tercera línea de prueba que comprende un tercer anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la tercera proteína.

- 5 13. El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 12, que comprende además un cuarto anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de una cuarta proteína seleccionada del grupo que consiste en complemento C5b, complemento C6, complemento C7, complemento C8, complemento C9, complemento C3 y factor B de la proteína del complemento, en el que dicha cuarta proteína es diferente de dicha primera proteína y dicha segunda proteína y dicha tercera proteína, y una cuarta línea de prueba que comprende un cuarto anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de la cuarta proteína.
- 10 14. El dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que los anticuerpos de detección comprenden cada uno un marcador que proporciona una señal diferente que distingue a cada uno de dichos anticuerpos de detección entre sí.

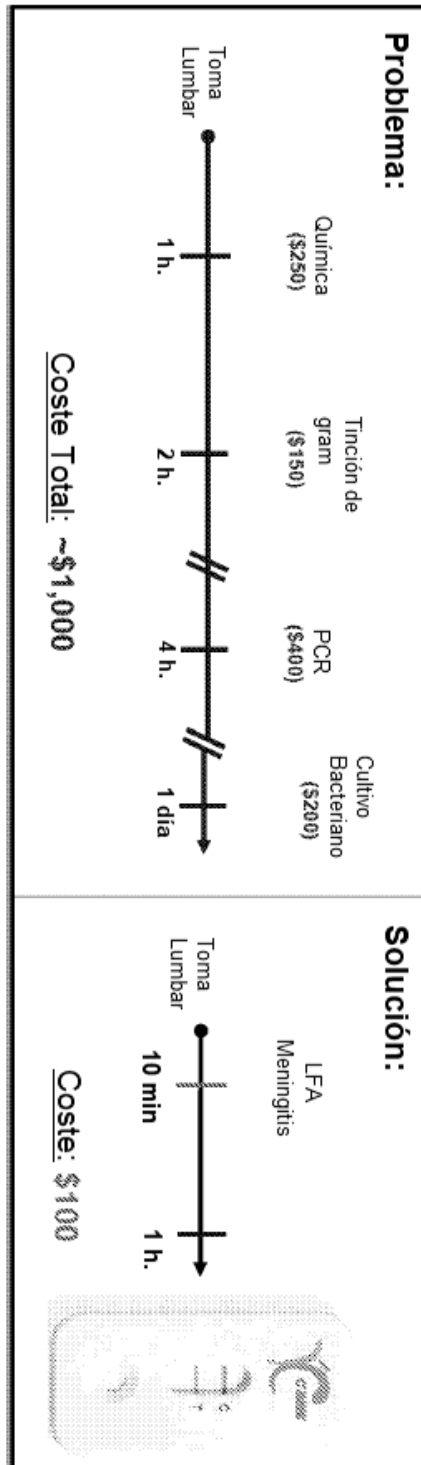


FIG. 1

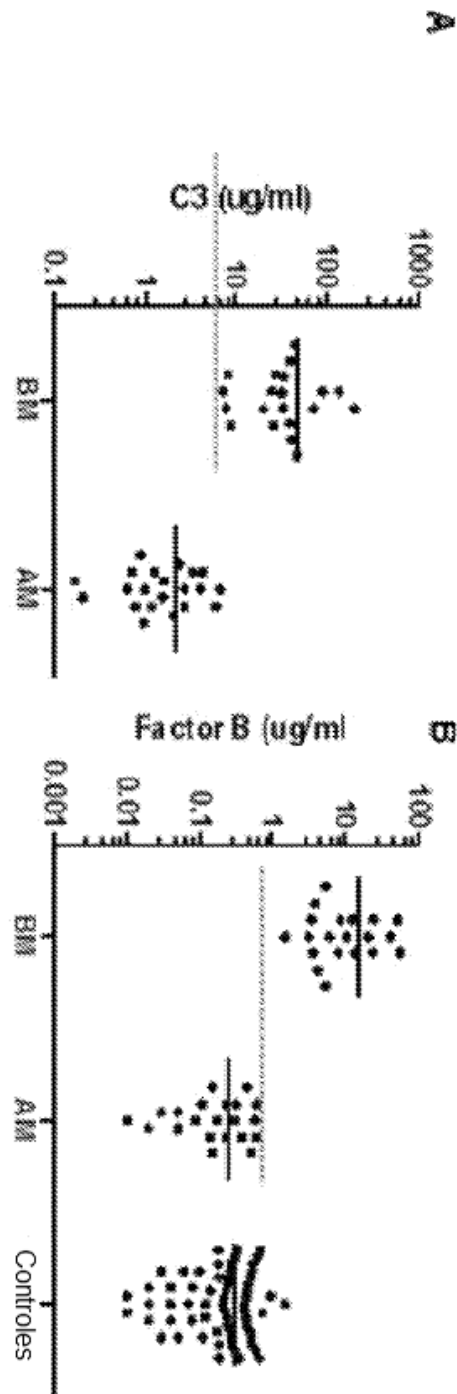


FIG. 2

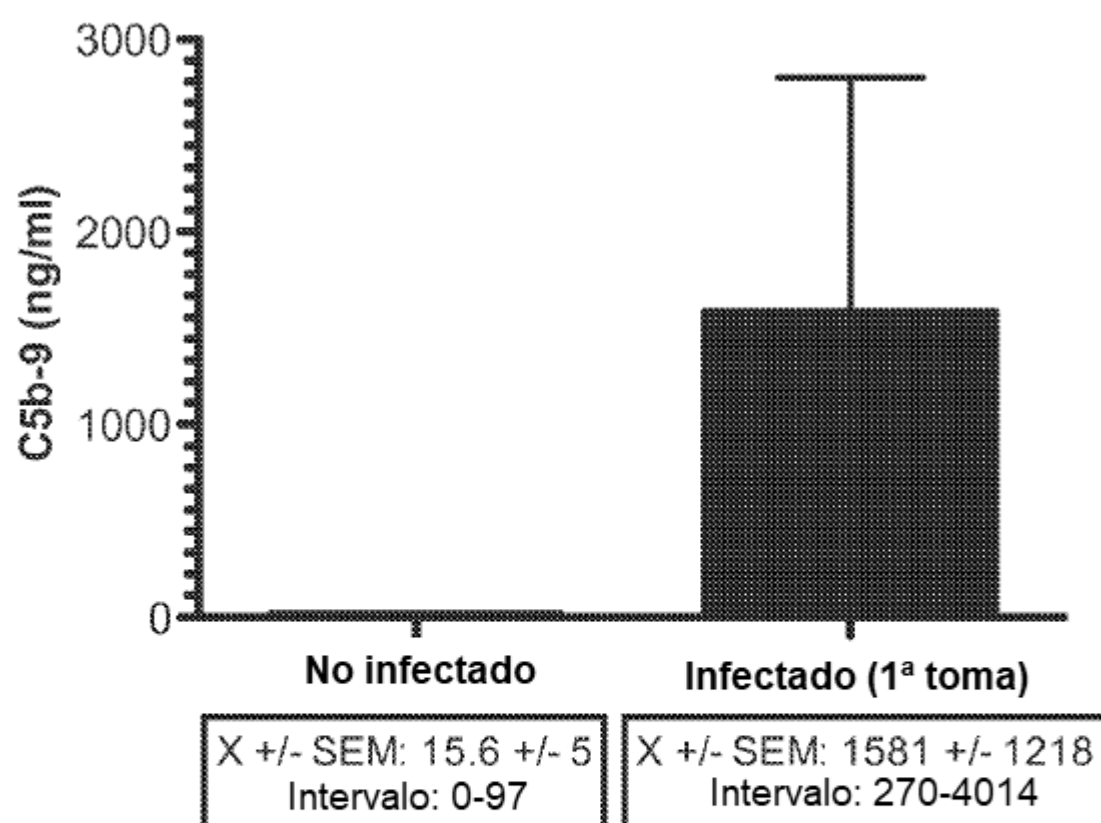


FIG. 3

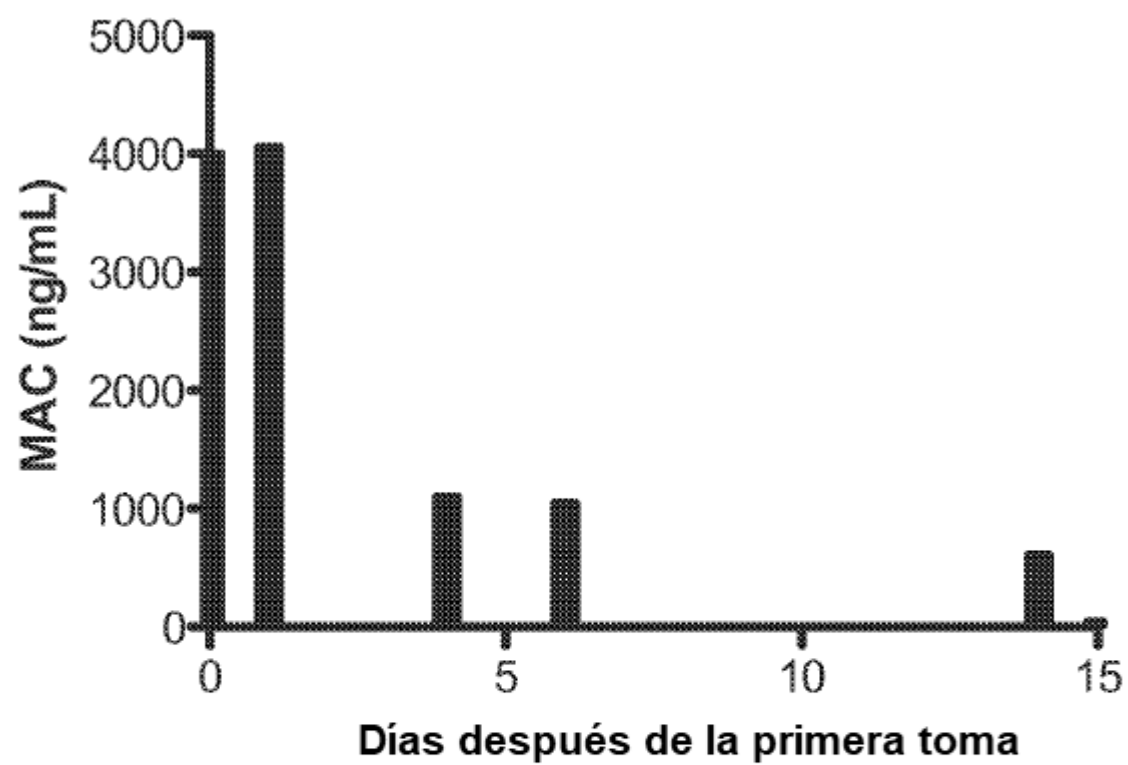


FIG. 4

Meningitis Bacteriana

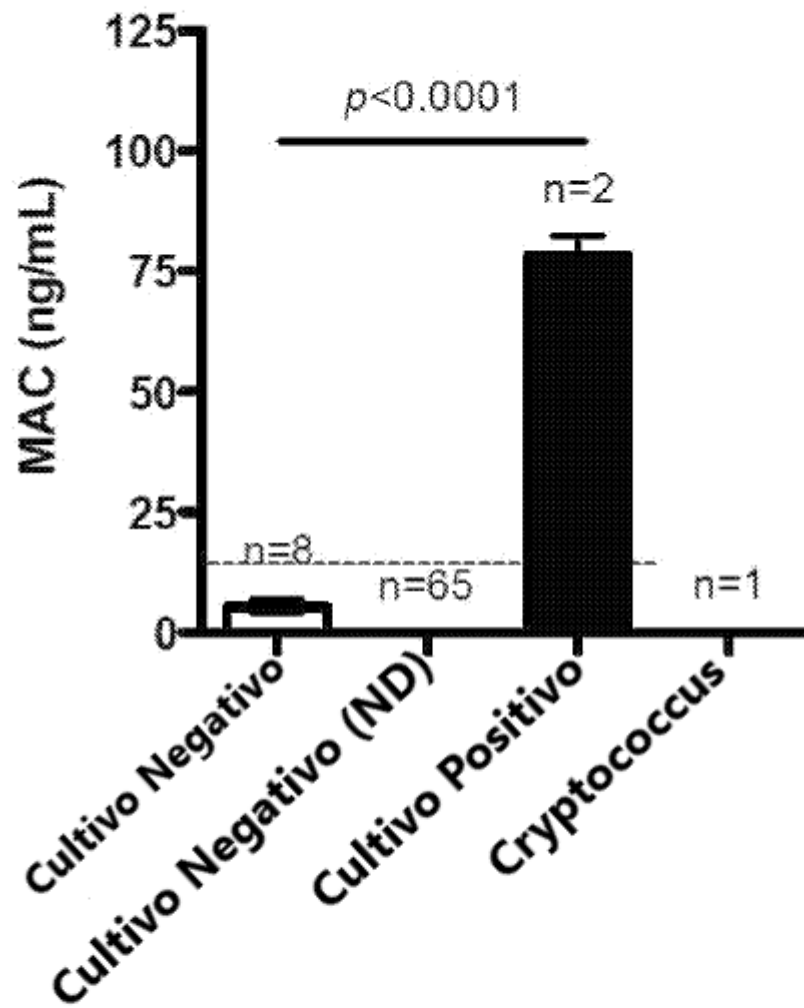
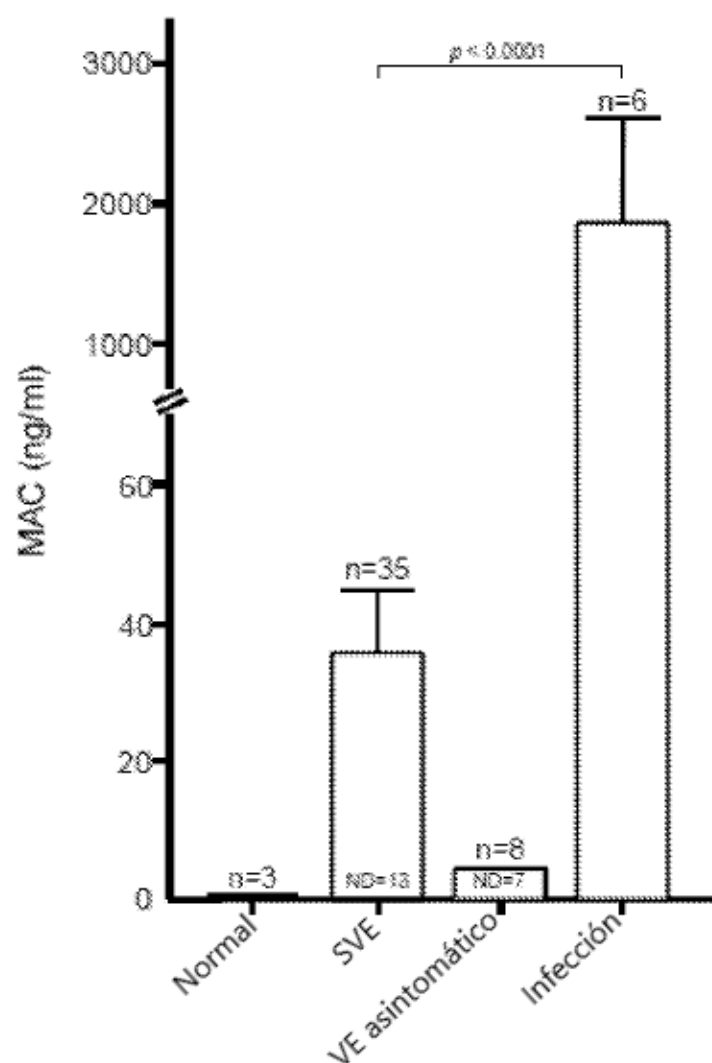


FIG. 5

Infecciones y fallas de la derivación



n = 61 pts.
 n = 58 eventos
 7 pts. excluido para la falta de la 1ª toma, irrigación, etc.
 ND = no detectado
 SVE = Agrandamiento ventricular sintomático

FIG. 6

Infecciones y fallas de la derivación

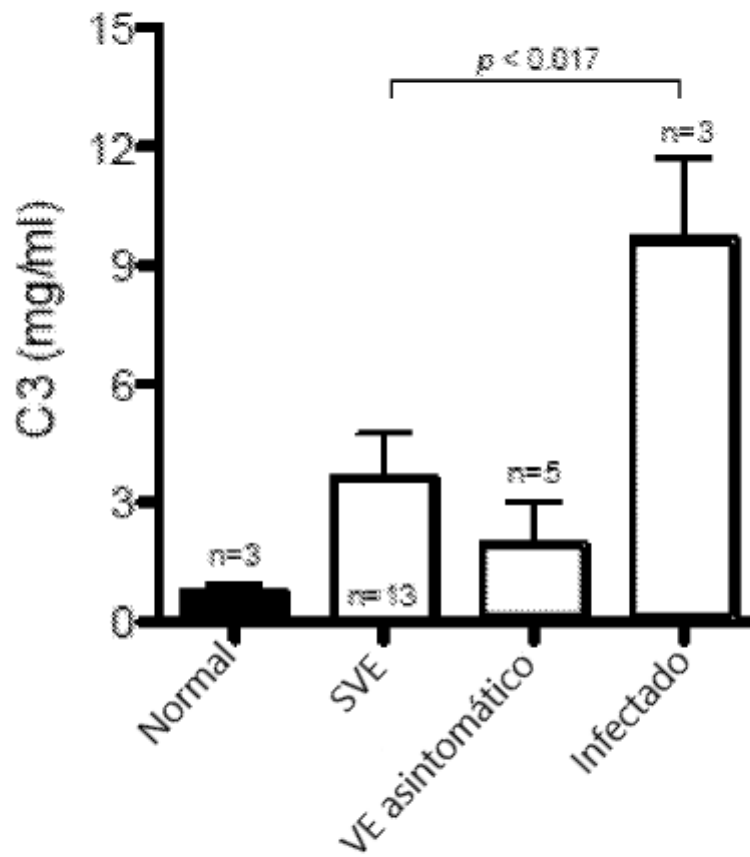


FIG. 7