



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 304 965**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00942182 .7**
(86) Fecha de presentación : **14.06.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1192469**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **03.04.2002**

(54) Título: **Ensayo.**

(30) Prioridad: **14.06.1999 GB 9913819**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

(73) Titular/es: **Plasmacut AS.**
Thormöhlensgt
5008 Bergen, NO

(72) Inventor/es: **Haaheim, Lars, Reinhardt**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Ensayo.

5 La presente invención se refiere a la detección de anticuerpos, y en particular a la detección de anticuerpos recién sintetizados producidos en respuesta a infección, vacunación, etc. en muestras mediante un método sencillo que implica el fraccionamiento de linfocitos antes de detectar la presencia de anticuerpo.

10 Se ha usado ELISA durante mucho tiempo para detectar y medir los niveles de anticuerpo (o antígeno). Lo más habitualmente, se usa ELISA como ensayo serológico, pero se usa también para estudiar las propiedades inmunoquímicas de antígenos o anticuerpos, y ha encontrado aplicación frecuentemente, por ejemplo, en la evaluación y caracterización de respuestas inmunitarias, para investigar la producción de anticuerpo por cultivos celulares, en tecnología de hibridoma, etc.

15 El ensayo ELISA es sencillo de usar, sensible y relativamente rápido, pero sólo es capaz de medir simplemente la presencia del anticuerpo diana en la muestra; no puede distinguir entre la síntesis de anticuerpo en curso en respuesta al antígeno y los anticuerpos ya presentes por infección pasada o por transferencia pasiva, etc. Aunque en algunos casos puede bastar simplemente con obtener información referente a la presencia de anticuerpo, en otros casos es deseable poder determinar si los anticuerpos diana detectados se sintetizan o no agudamente por los linfocitos en el momento del ensayo, por ejemplo, durante un tratamiento de vacunación, o en el diagnóstico de infección en lactantes, para distinguir de los anticuerpos maternos transferidos pasivamente. Esto no puede conseguirse en un método ELISA clásico.

25 Se han desarrollado por lo tanto otros métodos que posibilitan detectar la síntesis de anticuerpo en curso. Puede mencionarse particularmente a este respecto el ensayo de inmunosorción ligado a enzima de mancha (ELISPOT) (también conocido como ELISA de mancha o ensayo de placa ELISA), como se revisa, por ejemplo, por Czerkinsky *et al.* en "ELISA and other Solid Phase Immunoassays", ed. D.M. Kenneney and S.J. Challacombe, 1988, capítulo 10, 217-239. Esta técnica, basada en el método ELISA, posibilita la enumeración de linfocitos que secretan anticuerpos contra uno o más antígenos diana. Básicamente, ELISPOT es una variante del método ELISA con la cual pueden revelarse las células secretoras de anticuerpo (CSA) cultivando linfocitos en pocillos ELISA especialmente modificados recubiertos con el antígeno diana, y reemplazando los reactivos ELISA estándar por complejos de enzima-sustrato que proporcionan un precipitado coloreado (manchas) adyacente a la célula secretora. Pueden contarse después las manchas para dar una medida del número de células productoras de anticuerpo. Pueden incluirse inhibidores de la síntesis de proteína en el medio de cultivo para confirmar que las manchas detectadas son debidas a la síntesis de anticuerpo *de novo* durante el periodo de incubación *in vitro*.

Aunque la técnica ELISPOT se ha probado muy útil en el estudio de la dinámica de las respuestas inmunitarias humorales, y se ha usado para detectar CSA espontáneas que aparecen transitoriamente en la circulación periférica de sujetos inmunizados, ciertos rasgos del método ponen limitaciones a su uso en una situación de diagnóstico clínico. En primer lugar, puesto que para cada muestra tienen que contarse las manchas individuales, lo que puede consumir tiempo y ser laborioso, el método no es particularmente adecuado para el análisis de grandes números de muestras, tal como ocurre en un laboratorio de diagnóstico clínico. En segundo lugar, sólo se enumera el número de células secretoras de anticuerpo en cada muestra y, en términos generales, esto requiere volúmenes de muestra razonablemente grandes, por ejemplo, varios ml. Las placas ELISPOT son también caras y el ensayo no es fácilmente susceptible de automatización.

El documento WO 96/26443 describe el uso de un ensayo ELISA modificado que puede usarse para detectar la síntesis de anticuerpo en curso. En este ensayo, se cultivan linfocitos después de aislamiento y se determinan los niveles de anticuerpo producido durante ese periodo de cultivo. Esta técnica requiere por tanto necesariamente la incubación de los linfocitos de la muestra de ensayo aproximadamente a 37°C para permitir la medida de los anticuerpos secretados durante la incubación. El periodo medio de incubación es de 2-5 horas, lo que representa una limitación significativa para la velocidad de realización del ensayo. La incubación requiere también la provisión de un equipo adecuado en el sitio de ensayo de modo que pueda llevarse a cabo inmediatamente antes del procedimiento de ensayo. Esto significa generalmente que el ensayo de linfocitos tiene que llevarse a cabo poco después de haber tomado una muestra de un sujeto, debido a que el almacenamiento de muestras, por ejemplo congelando, no es aceptable debido a la reducción resultante de la viabilidad celular. Las células purificadas pueden mantenerse viables sólo durante periodos de tiempo relativamente cortos mediante almacenamiento en hielo a 0°C o menos favorablemente a 4°C.

Se observará por lo tanto que, a pesar de los avances en las técnicas de detección de anticuerpo, sigue habiendo la necesidad de un ensayo mejorado adicionalmente que sea sencillo, rápido y económico de realizar, que posibilite fiablemente la cuantificación precisa de anticuerpo secretado espontáneamente, que sea capaz de distinguir la síntesis de anticuerpo *de novo* y que pueda realizarse en muestras, por ejemplo muestras de sangre, con fines de diagnóstico. La presente invención responde a esta necesidad.

65 En la técnica descrita anteriormente, se usó un periodo de cultivo en consonancia con la opinión actual en el momento, suponiendo que éste fuera necesario para obtener suficiente título de anticuerpo para obtener resultados de ensayo con fines de inmunodiagnóstico.

Se ha establecido en la bibliografía que la biosíntesis de anticuerpos (inmunoglobulinas) tiene lugar en linfocitos B (véase: Roitt I., Brostoff J., Male D. "Immunology", 4ª edición publicada por Mosby, Londres 1996, 6.12-6.13), tras de lo cual se secretan a la corriente sanguínea para luchar contra la infección. Cuando se secretan por células secretoras de anticuerpo (CSA), las moléculas están totalmente ensambladas (por ejemplo, para una molécula de IgG, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas por enlaces disulfuro) y glucosiladas. Se ha reivindicado que la etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis de anticuerpos es el transporte intracelular y la glucosilación mediante el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi (que lleva 1 hora o más), mientras que la biosíntesis de las diversas cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas necesita sólo minutos para su terminación. En total, el proceso de síntesis y secreción se estima que lleva del orden de 2 horas (Melchers, 1971, *Histochemical J.*, 3, pág. 389-397). Como consecuencia de la rápida secreción de inmunoglobulinas por células, no se ha apreciado nunca antes que podrían estar presentes anticuerpos funcionales, o incluso anticuerpos parcialmente sintetizados (por ejemplo, preglucosilación) en la célula linfocítica en cualquier cantidad significativa. Además, no se ha apreciado que el fraccionamiento de los linfocitos en una muestra podría proporcionar suficientes cantidades de "anticuerpos recién sintetizados" para permitir la detección con fines de inmunodiagnóstico.

Atkinson *et al.* (1985, *J. Immunological Methods* 76, pág. 365-373) midieron la secreción de anticuerpo en suspensiones celulares usando un ensayo de inmunosorción ligado a enzima. Se incubaron células de bazo de ratones inmunizados durante 6 horas a 37°C y se midió el anticuerpo secretado por ELISA.

Sin embargo, se ha encontrado sorprendentemente que el contenido celular de los linfocitos contiene suficientes anticuerpos para permitir la detección e incluso la cuantificación de la síntesis aguda de anticuerpo en un sujeto cuando las muestras para análisis se toman durante la fase aguda de la respuesta inmunitaria. Generalmente, éste es aproximadamente el mismo intervalo de tiempo que se esperaría para la aparición de células secretoras de anticuerpo en sangre periférica. Por tanto, esto proporciona información útil que puede usarse en diagnóstico.

Ventajosamente, esto evita la necesidad de llevar a cabo una larga incubación de la muestra, por ejemplo una preparación de linfocitos purificada, antes del ensayo, puesto que el ensayo no requiere ninguna incubación de los linfocitos.

El ensayo de la invención proporciona también un ensayo fiable en el que las muestras pueden almacenarse antes de preparar el ensayo, por ejemplo, mediante refrigeración (preferiblemente aproximadamente a 4°C) o congelación, por ejemplo, a menos de 0°C. Se apreciará por los expertos en la técnica que la sangre completa preferiblemente se refrigera (por ejemplo, como se describe más adelante en la presente memoria) en lugar de congelarse, ya que la congelación de sangre completa dará como resultado la lisis de las células. Sin embargo, muestras tales como linfocitos purificados pueden congelarse o refrigerarse antes de realizar el ensayo de la invención sin interferir en los resultados de ensayo. Por tanto, las muestras pueden almacenarse durante un periodo prolongado de tiempo antes del ensayo incluso mediante métodos que puedan afectar a la viabilidad de las células (por ejemplo, de manera similar al almacenamiento de muestras de suero o plasma). Como consecuencia, el método de ensayo de la invención ofrece ventajas significativas para la recogida, almacenamiento y procesamiento de muestras, permitiendo particularmente un retraso significativo en la realización del ensayo que puede ser necesario para ensayos de laboratorio de muestras obtenidas en el campo.

En un aspecto, la presente invención proporciona por lo tanto un método de determinación de la presencia o cantidad de anticuerpo recién sintetizado en una muestra de sangre en respuesta a un inmunógeno que comprende:

detectar los anticuerpos liberados o partes de los mismos en una muestra que contiene linfocitos que se han fraccionado, con lo que se liberan los anticuerpos o partes de los mismos sintetizados asociados a dichos linfocitos, con lo que se determina la presencia o cantidad de anticuerpo recién sintetizado en dicha muestra de sangre, en los que dicha muestra que contiene linfocitos que se han fraccionado es dicha muestra de sangre o una preparación de linfocitos preparada a partir de dicha muestra de sangre,

en el que dicho anticuerpo recién sintetizado es un anticuerpo antigénicamente activo (concretamente, capaz de reconocer y unirse al antígeno correspondiente al inmunógeno) que se ha producido o sintetizado por y en una célula linfocítica en respuesta a la presencia de un inmunógeno *in vivo* como parte de una respuesta inmunitaria en curso. Por tanto, el anticuerpo se sintetiza por un linfocito durante el transcurso de una respuesta inmunitaria desencadenada por la presentación de un inmunógeno *in vivo*, concretamente, sintetizado antes y en el momento en que la muestra que contiene linfocito se retira del sujeto animal.

La referencia en la presente memoria a anticuerpos o partes de los mismos asociados a dichos linfocitos designa anticuerpos recién sintetizados o partes de los mismos que son antigénicamente activos (concretamente, capaces de reconocer y unirse al inmunógeno) que no se han secretado todavía por las células. Como se menciona anteriormente, esto corresponderá generalmente a anticuerpos producidos en las 2 horas precedentes (que puede ocurrir exclusivamente *in vivo* o al menos parcialmente *in vitro* antes del fraccionamiento celular si las células se mantienen en las condiciones apropiadas), aunque el transcurso temporal de la ruta de secreción puede variar. Aunque los anticuerpos pueden producirse rápidamente en las células (por ejemplo, 1-2 min, aunque la secreción es bastante más lenta), pueden estar presentes cadenas libres que constituyen anticuerpos o anticuerpos no glucosilados o parcialmente glucosilados o cadenas de anticuerpo en los linfocitos, y por tanto liberarse a su fraccionamiento. Cuando sea apropiado, estas "partes" pueden detectarse e incluirse en la medida de la presencia o cantidad de anticuerpos recién sintetizados

a condición de que sean antigénicamente activos como se describe anteriormente. Los anticuerpos o partes de los mismos liberados por los linfocitos comprenden anticuerpos recién sintetizados. La valoración de los niveles de dichos anticuerpos recién sintetizados proporciona información respecto a la cantidad de producción de anticuerpo activo que ocurre en respuesta a un inmunógeno particular, concretamente, anticuerpos que se están produciendo como parte de una respuesta inmunitaria en curso, por ejemplo crónica o aguda. La presente invención proporciona por tanto también un método de determinación de la presencia o cantidad de producción de anticuerpo activo mediante la correlación con los niveles de anticuerpos recién sintetizados con respecto a las muestras de control apropiadas.

La muestra que comprende linfocitos puede tomarse de cualquier animal, preferiblemente mamífero, por ejemplo un sujeto humano, al que se ha presentado un inmunógeno antes de tomar la muestra. Habitualmente, cuando la respuesta inmunitaria va a detectarse mediante el método de la invención, ésta estará causada por infección o vacunación reciente, y es deseable tomar la muestra al cabo de pocas semanas o al cabo de pocos días de la exposición al inmunógeno. El tiempo óptimo para tomar la muestra del sujeto dependerá de la naturaleza de la infección o del tipo de vacuna usada, y se determina adicionalmente por la eficacia del mecanismo de respuesta inmunitaria del sujeto, y ésta puede variar entre individuos. Sin embargo, lo que se requiere es que la muestra se tome en un momento en que los linfocitos del sistema inmunitario del sujeto estén en una fase de síntesis de anticuerpo aguda en respuesta al inmunógeno de interés. Por tanto, en general, se ha encontrado que la muestra se toma convenientemente al cabo de 3 semanas de la presentación al sujeto del inmunógeno, más preferiblemente al cabo de 8-12 días de la infección o vacunación, pero en algunos casos ocurrirá una producción suficiente de anticuerpo al cabo de 1-5 días; o más específicamente 2-3 días después de la infección o vacunación, para obtener resultados significativos de un ensayo según la invención.

La muestra es una muestra de sangre. Puede ser o no necesario separar y purificar los linfocitos antes del ensayo en el método de la invención. Sin embargo, cuando sea necesario o deseable, pueden purificarse los linfocitos. Por tanto, preferiblemente la muestra usada en el ensayo es una preparación de linfocitos preparada a partir de la fuente anteriormente mencionada mediante técnicas conocidas en la técnica.

Por “fraccionar” los linfocitos se pretende que los contenidos celulares, incluyendo cualquier anticuerpo sintetizado, se liberen de los confines de la membrana celular y las estructuras de membrana interna de tal modo que puedan detectarse mediante cualquier ensayo bioquímico o químico conveniente. Es conocido que las inmunoglobulinas se sintetizan y secretan durante una ruta a través del retículo endoplásmico y el complejo de Golgi. Por tanto, el fraccionamiento requiere necesariamente la liberación de estas estructuras internas. Por tanto, el fraccionamiento de los linfocitos puede conseguirse mediante métodos conocidos de fraccionamiento celular que permiten la liberación de los contenidos de los compartimentos de membrana, por ejemplo mediante lisis celular, por ejemplo usando medios de fraccionamiento físico, por ejemplo ciclos de congelación-descongelación o por medios químicos usando tampones o disoluciones de fraccionamiento celular.

Como se usan en la presente memoria, los términos “detectar” y “determinar la presencia o cantidad de” comprenden la valoración tanto cuantitativa como cualitativa del nivel de producción de anticuerpo, en el sentido de obtener un valor absoluto para la cantidad de anticuerpo producida en la muestra, y también un índice, relación, porcentaje o indicación similar del nivel de producción de anticuerpo, así como valoraciones semicuantitativas o cualitativas. El término “determinar la presencia de” comprende también situaciones en que un valor negativo, indicativo de la ausencia de anticuerpos sintetizados, es valioso en la valoración de la respuesta inmunitaria de un sujeto. Por ejemplo, un resultado negativo puede ser indicativo de la ausencia de una respuesta inmunitaria ante el inmunógeno de interés o puede ser indicativo de una infección crónica si los anticuerpos del inmunógeno de interés están presentes en el suero.

La detección de anticuerpos recién sintetizados permite la valoración de los niveles de dichos anticuerpos específicos de uno o más inmunógenos, en lugar de la valoración de todos los anticuerpos presentes en la célula.

La detección de los anticuerpos recién sintetizados puede ser mediante cualquier método que permita la identificación de aquellos anticuerpos que se unen al inmunógeno de interés causando la respuesta inmunitaria. Por tanto, puede usarse cualquier técnica de detección que dé como resultado la producción de una señal que refleje la presencia del anticuerpo diana. Por ejemplo, pueden usarse ensayos ligados a enzima en los que puede producirse un producto soluble o insoluble a partir de un sustrato cuya cantidad puede valorarse.

Convenientemente, los anticuerpos sintetizados pueden detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo de unión en fase sólida, por ejemplo un ELISA, en el que se unen al antígeno usado en el ensayo, aunque el antígeno usado puede ser diferente del inmunógeno que estimuló la respuesta inmunitaria en primer lugar. Por tanto, aunque tanto el antígeno usado en el ensayo como el inmunógeno que ha estimulado o está estimulando la producción de anticuerpos *in vivo* se unirían a los anticuerpos a detectar en virtud de sus epítomos idénticos o muy similares, en otros aspectos el antígeno y el inmunógeno pueden no ser idénticos. Por tanto, aunque el antígeno usado en el método de la invención puede ser material que contiene todas o algunas partes del inmunógeno relevante, por ejemplo, derivado de individuos infectados, o partes purificadas del mismo o similar material, el antígeno puede prepararse sintéticamente de forma similar, por ejemplo, mediante síntesis química o expresión recombinante, con porciones añadidas o eliminadas respecto al antígeno nativo. Por tanto, pueden usarse proteínas de fusión o moléculas que expresan sólo el(los) epítomo(s) apropiado(s).

La presente invención proporciona varias ventajas frente a las técnicas de ensayo de anticuerpo conocidas. En primer lugar, en contraposición con técnicas que detectan los niveles de anticuerpo sérico (por ejemplo, ELISA séri-

cas), el presente ensayo detecta anticuerpos que son indicativos de una infección/estimulación inmunitaria actual, o en el caso de neonatos, permite la separación de los anticuerpos maternos y neonatales. Esto es posible puesto que los linfocitos de la muestra se usan directamente en el método de ensayo de la invención sin ninguna otra forma de tratamiento o estimulación anterior, por ejemplo, estimulación *in vitro* por antígeno. Pueden detectarse así los anticuerpos que se están sintetizando por los linfocitos en el momento del muestreo. (De este modo, incluso usando volúmenes de muestra pequeños, puede distinguirse la síntesis de anticuerpo en curso espontánea en respuesta al inmunógeno de interés de la activación de linfocitos presente). Además, el ensayo se lleva a cabo en linfocitos que se han fraccionado durante la etapa en que producen y secretan espontáneamente, o están empezando a secretar, anticuerpos, sin estimular a las células a revelar ninguna memoria. Esto está en contraposición con otros métodos publicados que aprovechan la estimulación antigénica *in vitro* que puede aumentar la sensibilidad del ensayo, pero que revela la memoria celular y por lo tanto no es una técnica exacta o adecuada para detectar anticuerpos preparados agudamente o recién sintetizados en respuesta a una infección actual o vacunación reciente.

La presente invención aprovecha por otro lado la secreción espontánea de anticuerpo para permitir la detección de anticuerpos en la sangre indicativos de una infección en curso por el antígeno de ensayo; los linfocitos plasmáticos secretarán anticuerpo contra el antígeno de ensayo en las primeras pocas semanas después de la infección o vacunación, etc. La detección de dichos anticuerpos mediante el método de la presente invención posibilita diagnosticar o determinar la infección o monitorizar la respuesta de anticuerpo a la vacunación, etc.

Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de diagnóstico o monitorización de la infección de un animal humano o no humano o una parte de dicho animal por un inmunógeno realizando el método de la invención y determinando la presencia o extensión de la infección por dicho inmunógeno por referencia a controles y/o muestras de referencia apropiados.

El método de la invención es particularmente útil en lactantes y neonatos, en los que es importante distinguir el anticuerpo recién sintetizado de los anticuerpos maternos transferidos pasivamente. En la misma muestra que contiene linfocitos pueden analizarse los anticuerpos contra varios agentes infecciosos distintos en ensayos separados o en el mismo ensayo usando múltiples antígenos relevantes, permitiendo así el uso de antígenos de contacto relevantes coherentes con el síndrome clínico que se presenta en el paciente.

En el diagnóstico de infecciones, es también importante ser capaz de distinguir la síntesis de anticuerpo en curso de anticuerpos ya existentes de una infección anterior. Evocar la memoria inmunitaria por estimulación antigénica *in vitro* no es coherente con un ensayo dirigido a identificar una infección aguda en curso, y por tanto los métodos anteriores basados en la estimulación antigénica no comparten esta ventaja. Además, incluir la etapa de estimulación antigénica comprometería el factor tiempo beneficioso del ensayo de la invención, que es muy rápido de realizar comparado con métodos de la técnica anterior.

En segundo lugar, en contraposición con técnicas que detectan células secretoras de anticuerpo o anticuerpos secretados activamente, en la presente invención, aunque la síntesis aguda de anticuerpo forma el parámetro básico de detección, no hay necesidad de mantener la muestra en condiciones que promuevan la síntesis y/o secreción de anticuerpos. Esto simplifica en gran medida el ensayo y es particularmente beneficioso en comparación con el ensayo anteriormente conocido dado a conocer en el documento WO 96/26443, que requiere la incubación de los linfocitos después del muestreo, y también el mantenimiento de condiciones durante el ensayo que permitan que los linfocitos continúen secretando anticuerpos.

Ha sido un beneficio particularmente sorprendente de la presente invención la evitación de cualquier etapa de incubación o condiciones de ensayo especiales, y esto significa que las muestras pueden tratarse convenientemente después de muestrear para efectuar el fraccionamiento o lisis de las células, y el lisado puede almacenarse, por ejemplo mediante congelación o refrigeración, durante un periodo de tiempo antes de llevar a cabo la etapa de ensayo.

Como alternativa, como se menciona anteriormente, la muestra, por ejemplo sangre completa o una preparación purificada, puede almacenarse, por ejemplo congelando o por refrigeración (según sea apropiado, dependiendo de la muestra), durante un periodo de tiempo de, por ejemplo, hasta varias horas o días, por ejemplo, durante más de 4 horas, antes de fraccionar las células. Por ejemplo, podría almacenarse una preparación de linfocitos purificada congelando durante un periodo de tiempo, por ejemplo, durante varias horas o días, o mediante refrigeración, por ejemplo, durante unas pocas horas, si es necesario o deseable, antes de tratar la muestra para fraccionar las células. Por tanto, por ejemplo, los linfocitos purificados podrían almacenarse a 4°C durante varias horas, por ejemplo durante hasta 4 a 6 horas, antes de tratarlos para fraccionar o lisar las células.

Sin embargo, se ha encontrado sorprendentemente que algunas muestras, por ejemplo preparaciones de sangre completa, pueden almacenarse con refrigeración durante periodos de tiempo más largos sin afectar adversamente a las células ni interferir en los resultados de ensayo. Por ejemplo, se ha encontrado que las muestras de sangre completa pueden almacenarse con refrigeración (por ejemplo, a 4°C) durante al menos 6 días, y si se desea las muestras pueden mantenerse intermitentemente a temperatura ambiente (18-25°C) durante al menos 6 horas, antes de iniciar los procedimientos de purificación de linfocitos sin afectar adversamente a la actuación del ensayo. Esto es particularmente útil cuando las muestras de sangre están retenidas en el laboratorio y se almacenan con refrigeración mientras están pendientes los resultados de procedimientos de ensayo plasmáticos/séricos rutinarios o suplementarios. Esto es sorprendente e inesperado, puesto que implica que se mantiene la integridad física de los linfocitos durante el alma-

cenamiento, permitiendo así tener lugar la purificación posterior de linfocitos a partir de la sangre almacenada (si se desea) y el fraccionamiento de los linfocitos sin una reducción significativa de los anticuerpos que se están detectando.

Por tanto, en una realización preferida, antes del fraccionamiento de los linfocitos, por ejemplo cuando la muestra es sangre, la muestra puede almacenarse durante varios días, por ejemplo, hasta aproximadamente 6 días o más, específicamente cuando se almacena con refrigeración aproximadamente a 4°C, permitiendo incluso la retirada de la muestra de su entorno refrigerado durante periodos intermitentes de, por ejemplo, 4 a 6 horas, por ejemplo a temperatura ambiente en dos o más ocasiones durante el periodo de almacenamiento, sin afectar adversamente a los resultados del ensayo. Esto es particularmente útil cuando se almacenan muestras de sangre con refrigeración pero cuando es inevitable dejar la muestra en la mesa de trabajo a temperatura ambiente durante un tiempo corto. Sorprendentemente, se ha encontrado que la viabilidad celular no se afecta suficientemente para interferir o evitar obtener resultados aceptables según el método de ensayo de la invención. En una realización preferida adicional, cuando se usan preparaciones de linfocitos purificadas, estas muestras pueden almacenarse a menos de 4°C (por ejemplo, durante varios días o más) o almacenarse a más de 4°C (durante hasta 6 horas). La posibilidad de almacenar diversas muestras para uso en el ensayo hace al método de la invención particularmente adecuado para laboratorios de diagnóstico grandes en que el equipo de laboratorio de diagnóstico automatizado costoso, por ejemplo hardware ELISA, puede operarse más eficazmente usando un número sustancial de muestras cada vez. Significa también que las muestras pueden tomarse en muchas localizaciones diferentes y enviarse o expedirse a un laboratorio de diagnóstico central para análisis de manera similar a los procedimientos fijados para análisis de muestras de sueros químicos en otros tipos de ensayos.

Es una ventaja importante de la presente invención que sólo son necesarios volúmenes pequeños de muestra. Tan pocos como 100.000 linfocitos o incluso menos de 50.000 linfocitos pueden producir una señal detectable en el método de la invención. Puesto que, por ejemplo, 1 ml de sangre comprende 1×10^6 linfocitos, si se usa el método de la invención para ensayar linfocitos derivados de la sangre, puede usarse tan pocos como 50 ó 100 μl de sangre para proporcionar suficientes linfocitos para la realización de la invención. Incluso teniendo en cuenta los ensayos de control apropiados (por ejemplo, blancos y positivos de ensayo), pueden usarse tan pocos como 150 a 300 μl para proporcionar resultados de diagnóstico. Claramente, se renuncia al menos a algunas muestras de control una vez se estandariza el ensayo. Por tanto, el ensayo de la invención requiere convenientemente, por ejemplo, 50-500 μl , preferiblemente 100-300 μl y habitualmente 100-200 μl de muestra que contiene linfocitos en un volumen comparable con la fuente de muestra completa. Por tanto, el método de la invención puede usar, por ejemplo, 5×10^4 a 5×10^5 , preferiblemente 1 a 2×10^5 linfocitos. Esto está en contraposición con los ensayos de diagnóstico clásicos que generalmente se basan en volúmenes de varios ml de suero u otro fluido. Esto es especialmente útil en el caso de muestreos de sangre en que sólo están disponibles muestras pequeñas, por ejemplo, de neonatos, ya que el método de la invención requiere sólo volúmenes de μl que pueden tomarse, por ejemplo, por tubo capilar de un sitio adecuado tal como del lóbulo de la oreja, punta del dedo o talón.

Por tanto, el método de la invención permite el uso de volúmenes de muestra de sangre pequeños (por ejemplo, volúmenes de μl , menos de 1 ml, preferiblemente menos de 500 μl , por ejemplo, menos de 100 μl) directamente para detectar la producción de anticuerpo espontánea o *de novo* por linfocitos no estimulados, sin una etapa anterior de precultivo de linfocitos antes del ensayo.

Los antígenos o inmunógenos a los que están dirigidos los anticuerpos para detección según el método de la invención incluyen tanto antígenos bacterianos como víricos. Los antígenos clínicamente importantes incluyen, pero sin limitación, aquellos de, por ejemplo, herpesvirus simple, citomegalovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y cualquiera de los virus de la hepatitis, así como *Toxoplasma* y virus de Epstein-Barr (EBV). Sin embargo, en general, puede detectarse mediante el método de la invención cualquier inmunógeno que surja como resultado de una infección o vacunación que desencadene una clara respuesta de anticuerpo (por ejemplo, durante la fase aguda). En casos en que la infección crónica da como resultado niveles detectables de anticuerpos diana en los linfocitos, el ensayo de estos anticuerpos puede realizarse también según el método de la invención. Por tanto, por ejemplo, los anticuerpos de cualquier inmunógeno que pueda detectarse usando un método ELISA convencional pueden detectarse mediante el método de la presente invención. La detección de anticuerpos de dichos antígenos podría usarse para establecer rápidamente si los pacientes están infectados, por ejemplo, con fines de examen de sangre o para comprobar y/o monitorizar la infección.

La presente invención proporciona por tanto adicionalmente un método de diagnóstico o monitorización de infección de un animal humano o no humano o una parte de dicho animal por una bacteria o virus, en el que dicho método comprende determinar en una muestra que contiene linfocitos de dicho animal la presencia o cantidad de anticuerpos recién sintetizados o partes de los mismos asociados a linfocitos dirigidos a dicha bacteria o virus según el método descrito en la presente memoria, y determinar la presencia o extensión de la infección por dicha bacteria o virus por referencia a muestras de control y/o referencia apropiadas.

El método es particularmente útil debido a su simplicidad y puede usarse cuando no está disponible un equipo elaborado, por ejemplo, en situaciones de campo. Sin el requisito de incubar la muestra como parte del método de ensayo, el método es rápidamente susceptible de procedimientos automatizados, pero es también relativamente rápido y sencillo llevar a cabo la lisis celular y la detección de anticuerpo en situaciones en que no está disponible un equipo complejo.

El método de la invención se describirá ahora con más detalle. Preferiblemente, la primera etapa del método comprende el aislamiento de linfocitos de la muestra. Sin embargo, como se menciona anteriormente, no se requiere necesariamente una preparación de linfocitos purificada y, en lugar de ello, puede usarse una preparación en la que se hayan retirado la mayoría de los anticuerpos plasmáticos. Preferiblemente, dicha preparación puede contener menos de un 15% de los anticuerpos contribuidos por los anticuerpos plasmáticos presentes en la muestra, por ejemplo, menos de un 5%, preferiblemente menos de un 1%. Convenientemente, esto puede conseguirse empleando una preparación esencialmente exenta de plasma (por ejemplo, menos de 5% (v/v), por ejemplo, una preparación exenta de plasma. Puede prepararse una preparación de linfocitos usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica, por ejemplo, usando métodos de filtración o técnicas que usan material absorbente o kits de preparación de linfocitos. Por tanto, pueden usarse convenientemente diversas preparaciones de sangre completa para obtener los linfocitos, por ejemplo, a partir de sangre heparinizada, sangre con EDTA, etc., tales como se preparan rutinariamente en laboratorios clínicos. Se apreciará que todas las preparaciones enriquecidas o purificadas deben contener los linfocitos presentes en la muestra de la que deriva la preparación para permitir la detección de la producción de anticuerpos espontánea o *de novo*.

Preferiblemente, se separan los linfocitos, por ejemplo usando medios de separación de linfocitos estándar, por ejemplo, Lymphoprep® (Nycomed Pharma AS, Oslo, Noruega), o usando separación inmunomagnética (IMS) o un sistema de separación basado en fase sólida similar u otras técnicas comunes. En el caso de IMS o técnicas de separación similares, puede usarse una fase sólida, por ejemplo perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo específico de ciertos conjuntos de leucocitos, para separar selectivamente los linfocitos útiles. Cuando se usan linfocitos separados, las células pueden lavarse antes del uso, usando métodos de lavado estándar. Preferiblemente, se lavan los linfocitos para retirar cualquier anticuerpo plasmático que pueda estar presente después de la separación celular. En general, para realizar la invención, la contaminación de las células linfocíticas por anticuerpos plasmáticos se mantiene al mínimo, preferiblemente por debajo de 20 ng de IgG plasmática por muestra de 100 μ l, que representa aproximadamente un factor de dilución final del plasma de 1:50.000, por ejemplo, por debajo de aproximadamente 0,5 ng de IgG sérica por muestra de 100 μ l. Sin embargo, se ha observado que para conseguir esto no es necesario un lavado excesivo o extenso de las células. Por ejemplo, se ha encontrado que centrifugando simplemente sangre completa diluida con tampones tres veces aproximadamente en las mismas condiciones de giro, puede obtenerse una preparación de linfocitos suficientemente exenta de anticuerpos séricos/plasmáticos contaminantes. Véase el ejemplo 3 para detalles adicionales.

En términos generales, el método de la invención evita la necesidad de incubar linfocitos de la muestra antes de realizar el ensayo. Se apreciará sin embargo que si las células se mantienen durante cortos periodos de tiempo en condiciones que permitan una producción o secreción continuada de anticuerpos antes del fraccionamiento de los linfocitos, el método de la invención seguirá permitiendo la valoración de anticuerpos recién sintetizados asociados a los linfocitos.

Las muestras a analizar, que se han tratado como se menciona anteriormente si es necesario para obtener los linfocitos separados, se fraccionan después para liberar anticuerpos recién sintetizados. Esto puede realizarse mediante cualquier técnica conveniente conocida en la técnica anterior que fraccione eficazmente las estructuras de membrana externa e interna sin afectar a la capacidad de los anticuerpos liberados de unirse a sus epítopos complementarios, por ejemplo, mediante el uso de detergentes, agentes caotrópicos, tampones de fraccionamiento, por ejemplo que contienen EDTA, o métodos alternativos de fraccionamiento tales como sonicación o fraccionamiento físico mediante la generación de estrés de cizallamiento. Sin embargo, preferiblemente se usa un tampón de fraccionamiento ya que ésta es generalmente la técnica más sencilla y más conveniente, por ejemplo, como se describe en los ejemplos de la presente memoria, concretamente, tampón que contiene detergente tal como desoxicolato al 0,5%. Pueden usarse tampones de fraccionamiento apropiados para estabilizar los anticuerpos liberados, por ejemplo, para controlar el pH o la degradación. Por tanto, por ejemplo, pueden emplearse tampones que contienen inhibidores de proteasa si es necesario. Los métodos alternativos de fraccionamiento incluyen, por ejemplo, el uso de ciclos de congelación/descongelación o incluso el uso de nitrógeno líquido. Esto da como resultado un lisado en el que los anticuerpos liberados están en disolución que se usa para etapas posteriores. Se apreciará que, para obtener cantidades suficientes de anticuerpos recién sintetizados en la muestra para detectar, es deseable que se fraccionen todas las células linfocíticas posibles para liberar los anticuerpos. Preferiblemente entonces, el medio de fraccionamiento es adecuado con este fin y se fraccionan al menos un 40% ó 50%, más preferiblemente al menos un 60%, 70% u 80% y más preferiblemente al menos un 90% ó 95% de los linfocitos en la muestra. Después del fraccionamiento de los linfocitos, se valora el contenido de anticuerpo de la muestra mediante una técnica apropiada que permita la detección de los anticuerpos diana. Convenientemente, para conseguir esto la muestra puede ponerse en contacto con una fase sólida que porta una pareja de unión apropiada para inmovilizar el anticuerpo o anticuerpos para detectar. Convenientemente, la pareja de unión es el antígeno (inmunógeno) o antígenos (concretamente uno o más) reconocidos por el anticuerpo o anticuerpos o partes de los mismos para detectar. Se da a conocer también un método de determinación de la presencia o cantidad de anticuerpo recién sintetizado en una muestra, comprendiendo dicho método:

poner en contacto alícuotas de dicha muestra, u opcionalmente de linfocitos aislados directamente de dicha muestra, en las que dichos linfocitos se han fraccionado para liberar anticuerpos o partes de los mismos asociados a dichos linfocitos, con uno o más antígenos, preferiblemente portados en una fase sólida, reconocidos por el anticuerpo o anticuerpos para detectar;

detectar la unión de anticuerpo a dicho(s) antígeno(s); y

comparar dicha unión de anticuerpo con muestras de control y/o referencia, con lo que se obtiene una determinación de la presencia o cantidad de anticuerpo recién sintetizado en respuesta a dicho(s) antígeno(s). En el método anterior, las muestras de control o referencia pueden ser controles negativos o positivos apropiados, por ejemplo, blancos, muestras normales o muestras adicionadas.

Pueden usarse también parejas de unión alternativas, por ejemplo, proteína A, proteína G o anticuerpos que reconocen y se unen al anticuerpo para detectar. En el último caso, no se requiere una unión altamente específica ya que la especificidad se introduce en esta realización del método de ensayo mediante la unión posterior de antígenos que se unen específicamente a los anticuerpos para detectar. Por tanto, en todas las realizaciones se crea un complejo antígeno-anticuerpo específico. La presencia de dichos complejos, preferiblemente inmovilizados en un soporte sólido, se comprueba en la etapa de detección del método de la invención. Por tanto, en un rasgo preferido, la etapa de detección del método de la invención comprende la detección de los anticuerpos liberados o partes de los mismos mediante la formación de un complejo anticuerpo:antígeno en la que dicho antígeno (que preferiblemente no es un anticuerpo) comprende o contiene el inmunógeno o una parte del mismo que contiene al menos el epítipo del inmunógeno.

La fase sólida, cuando se emplea, puede ser cualquiera de los soportes o matrices bien conocidos que se usan ampliamente en la actualidad o se proponen para inmovilización, separación, etc. Estos pueden tomar la forma de partículas, láminas, geles, filtros, membranas o tiras, tubos o placas de microvaloración, etc. y pueden estar constituidos convenientemente por un material polimérico. Sin embargo, por facilidad de operación y simplicidad, pueden usarse convenientemente placas y pocillos de microvaloración estándar, preferiblemente placas ELISA estándar.

La fase sólida puede modificarse también para permitir la detección de anticuerpos específicos de una serie de antígenos diferentes. Por tanto, por ejemplo, pueden recubrirse discos o tiras, etc. de un material en fase sólida adecuado, por ejemplo nitrocelulosa o similares, con diferentes antígenos y añadirse simultáneamente a un pocillo de microvaloración u otro recipiente adecuado que no contenga antígeno de contacto. Pueden usarse entonces métodos de detección de unión de anticuerpo para distinguir entre los diferentes antígenos. Convenientemente, cuando se emplean ensayos de tipo sándwich, la fase sólida porta uno o más antígenos (antígenos en fase sólida) reconocidos por el anticuerpo o anticuerpos o partes de los mismos para detectar (anticuerpos diana). Como alternativa, la fase sólida puede portar uno o más anticuerpos (anticuerpos en fase sólida) que reconocen el anticuerpo o anticuerpos o partes de los mismos para detectar (anticuerpos diana). Para permitir la detección según el método de la invención, según sea apropiado, dependiendo de si dicho soporte sólido porta anticuerpos o antígenos como se describe anteriormente, se ponen en contacto uno o más antígenos, reconocidos por los anticuerpos diana inmovilizados sobre dicha fase sólida, con dicha fase sólida o como alternativa se ponen en contacto uno o más anticuerpos, que reconocen anticuerpos diana inmovilizados sobre dicha fase sólida, con dicha fase sólida. Estos antígenos o anticuerpos que se unen después al soporte sólido pueden marcarse apropiadamente para permitir la detección como se describe en adelante en la presente memoria.

Pueden usarse conjuntos de discos recubiertos cada uno con antígenos relevantes coherentes con cierta afección o síndrome clínico para identificar cuál de los agentes sospechosos está causando la enfermedad. Los discos se procesarían entonces individualmente en pocillos separados. Este es un procedimiento particularmente ahorrativo de material, puesto que pueden realizarse ensayos para el ensayo simultáneo de una multiplicidad de antígenos diferentes (del mismo agente infeccioso o de agentes diferentes relevantes para el síndrome o afección clínica en cada caso) usando el mismo pequeño volumen de sangre. Es un enfoque alternativo usar múltiples muestras de linfocitos fraccionados, concretamente en pocillos separados, cada uno recubierto con diferentes parejas de unión, por ejemplo, antígenos o anticuerpos, y desarrollar el ensayo en consecuencia.

Las técnicas para unir la pareja de unión, por ejemplo antígeno, a la fase sólida son también extremadamente bien conocidas y están ampliamente descritas en la bibliografía. Se describen muchos procedimientos de recubrimiento de antígeno estándar, por ejemplo en "ELISA and other solid phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects", 1988, ed. D.M. Kemeny & S.J. Challacombe, John Wiley & Sons. Si se desea, las placas pueden lavarse y bloquearse, usando de nuevo técnicas estándar. Por tanto, por ejemplo, pueden recubrirse simplemente placas de microvaloración estándar, por ejemplo placas ELISA, con pareja de unión incubando las placas durante una noche a 4°C en un tampón adecuado, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato (DSTF) que contiene la pareja de unión, por ejemplo, a concentraciones de 0,01 a 150 µg/ml de proteína, seguido de bloqueo usando medios de bloqueo apropiados (generalmente un tampón neutro tal como DSTF que contiene una proteína de bloqueo, por ejemplo, suero bovino o proteínas de leche en polvo) e incubando, por ejemplo, a 37°C durante 1 a 5 horas. Después de retirar la disolución de bloqueo, las placas están listas para usar.

Sin embargo, convenientemente los materiales necesarios para realizar el método de la invención pueden proporcionarse en forma de kit, en la que el soporte sólido se suministra listo recubierto con pareja de unión y apropiadamente bloqueado.

Puede ser deseable diluir la suspensión de muestra linfocítica fraccionada antes de la etapa de contacto, y convenientemente pueden usarse una serie de diluciones de célula/muestra. La dilución se realizará generalmente usando el tampón en el que se fraccionan los linfocitos como diluyente.

Se detecta entonces la unión del anticuerpo a su antígeno. La etapa de detección, en términos de lectura de la señal, tiene lugar convenientemente en disolución. Sin embargo, puede generarse un producto o señal insoluble que

no se lee en disolución. Puede usarse cualquiera de los medios conocidos de detección de unión de anticuerpo siempre que se genere una señal legible, por ejemplo, dependiente de fluorescencia, quimioluminiscencia, colorimetría o una reacción enzimática para producir la señal detectable. Cuando no se usa una fase sólida, los anticuerpos liberados pueden detectarse mediante cualquier otro método serológico sensible tal como dispersión de luz (por ejemplo, nefelometría) y procedimientos de resonancia. Convenientemente, puede usarse un inmunoensayo como medio de detección, y preferiblemente un ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA). Sin embargo, están contemplados procedimientos de ensayo distintos de ELISA dentro del alcance de la invención para detectar anticuerpos. Pueden ser adecuadas técnicas que usan discos o placas de vidrio recubiertos, por ejemplo, inundados con una suspensión de linfocitos fraccionados. Puede adoptarse cualquier técnica estándar para detectar anticuerpos conocida en la técnica, tales como técnicas que den como resultado un producto insoluble o soluble, para uso en el método de la invención para análisis cuantitativo o para un tipo de ensayo cualitativo (por ejemplo, sí/no).

Las técnicas de inmunoensayo, y particularmente ELISA, son bien conocidas en la técnica y se describen en la bibliografía (véase, por ejemplo, "ELISA and other solid phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects", 1988, ed. D.M. Kemeny & S.J. Challacombe, John Wiley & Sons).

Después de poner en contacto con la muestra de linfocitos fraccionados, puede añadirse un conjugado de enzima-anticuerpo, por ejemplo en el método de detección ELISA, que se une al anticuerpo unido al antígeno en la fase sólida. De forma similar, si el anticuerpo a detectar está unido a la fase sólida no específicamente mediante una pareja de unión, por ejemplo mediante un anticuerpo contra anticuerpos de una especie diferente, puede añadirse un conjugado de enzima-antígeno que se unirá específicamente con el anticuerpo inmovilizado para detectar. Se añade entonces un sustrato enzimático para desarrollar la señal detectable. En la presente invención, se usa convenientemente un sustrato soluble, proporcionando una señal detectable en disolución. Esto es ventajoso puesto que facilita y simplifica el manejo y procesamiento de un gran número de muestras y permite la estimación de la producción de anticuerpo, aunque como se menciona anteriormente no sea necesaria la cuantificación absoluta, y si se desea puede obtenerse un resultado cualitativo o semicuantitativo. Por conveniencia, el sustrato puede seleccionarse para proporcionar una señal espectrofotométricamente detectable, que puede simplemente leerse mediante lectura de absorbancia, por ejemplo, usando un lector de placa ELISA estándar. Es más, pueden usarse reactivos ELISA estándar, lo que tiene la ventaja de volver al ensayo de la invención compatible con los métodos y técnicas existentes empleados rutinariamente en laboratorios clínicos. Sin embargo, pueden usarse otros sistemas de detección/generadores de señal, proporcionando señales detectables por fluorescencia, quimioluminiscencia, etc.

Pueden usarse también métodos de amplificación inmunoenzimática para mejorar la señal y aumentar la sensibilidad, por ejemplo, usando métodos de avidina-biotina tales como el sistema Extravidin disponible en Sigma. Se usan anticuerpos secundarios biotinilados como reactivos ELISA, en combinación con un complejo de peroxidasa-avidina. Puesto que una molécula de avidina es capaz de unirse a varias moléculas de biotina, el uso de complejos de peroxidasa-avidina-biotina aumenta la concentración superficial de moléculas de peroxidasa, dando al método una sensibilidad aún mayor.

Los materiales y medios requeridos para la etapa de fraccionamiento de linfocitos y la etapa de detección de la unión a anticuerpo pueden suministrarse también convenientemente en forma de kit junto con la fase sólida recubierta con pareja de unión.

La información obtenida a partir del ensayo de la invención puede complementarse usando otros métodos de ensayo. Pueden obtenerse datos adicionales y útiles de los anticuerpos séricos/plasmáticos preexistentes en un ensayo ELISA clásico. Adicionalmente, después de la separación de linfocitos de la muestra de sangre, el fluido plasmático restante puede usarse para detectar los anticuerpos preexistentes usando la misma fase sólida recubierta de pareja de unión usada en el ensayo de la invención.

Para asegurar que el método de ensayo de la invención está funcionando fiablemente, pueden incluirse controles apropiados y usarse para determinar la presencia o cantidad de anticuerpo recién sintetizado. Por ejemplo, para comprobar que la señal registrada en los pocillos de ensayo no es debida a linfocitos activados esporádica y no específicamente (presentes), se usa un antígeno de control negativo. Este antígeno sería del agente infeccioso más improbable que sea responsable de la enfermedad infecciosa del paciente, por ejemplo, toxoide del tétanos. Los números de dichos linfocitos activados presentes serán en cualquier caso mucho menores en todas las circunstancias que los requeridos para un resultado de ensayo positivo usando el método de la invención. El diseño de la invención tiene en cuenta este punto.

Como se menciona anteriormente, debido a su facilidad y velocidad de operación y simplicidad, el ensayo de la invención se presta a usos de diagnóstico u otros clínicos o veterinarios, por ejemplo, piscifactoría. Además de los pequeños volúmenes de muestra, es una ventaja adicional que sólo se requiera una muestra, en lugar de pares de suero tomados a un intervalo de 2 a 3 semanas, tal como se requiere en la mayoría de los ensayos serológicos convencionales. No se requiere una instrumentación elaborada, y el ensayo se automatiza fácilmente. Además, debería ser posible ensayar diferentes isotipos de inmunoglobulina si es necesario.

El método de ensayo de la invención anteriormente mencionado proporciona un método para valorar la presencia o extensión de la infección en curso en virtud del análisis de la expresión espontánea de anticuerpos específicos de un antígeno definido. Dicho método es claramente aplicable a la valoración de condiciones patológicas que son conocidas y en las que están disponibles antígenos relacionados con el inmunógeno relevante, y por tanto se proporciona un

marcador específico de infección. Sin embargo, en algunas situaciones clínicas, la enfermedad o infección específica puede no estar identificada y/o el antígeno apropiado puede no estar disponible para uso en el ensayo. En estos casos alternativos, puede usarse un ensayo alternativo para valorar la presencia o extensión de indicadores no específicos de infección. Por tanto, por ejemplo, pueden examinarse muestras que contienen linfocitos, por ejemplo, sangre completa o preparaciones de linfocitos purificadas o enriquecidas de la misma, con respecto a su producción de marcadores de infección, por ejemplo, citocinas o interferones, por ejemplo, IL-2, IL-4 o interferón γ .

Este ensayo proporciona un método de determinación de la presencia o cantidad de indicadores de infección en una muestra en respuesta a un inmunógeno que comprende:

obtener una muestra que contiene linfocitos;

fraccionar dichos linfocitos, con lo que se liberan los indicadores de infección para detectar; y

detectar los indicadores de infección liberados, con lo que se determina la presencia o cantidad de indicadores de infección en dicha muestra.

Para realizar este método, la fase sólida puede proporcionarse con moléculas de captura apropiadas, por ejemplo, anticuerpos de los indicadores de infección para detección. Para la detección de la presencia de dichos indicadores de infección inmovilizados sobre la fase sólida, pueden usarse métodos como se describen anteriormente en la presente memoria, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos o ligandos marcados. En este método, pueden identificarse marcadores específicos mediante la elección apropiada del resto inmovilizante o molécula de detección. Por tanto, por ejemplo, pueden inmovilizarse todas las proteínas de la muestra sobre el soporte sólido y puede realizarse la detección usando un anticuerpo o ligando marcado específico. Como alternativa, puede usarse una pareja de unión específica para inmovilizar los indicadores de infección pertinentes, que pueden marcarse entonces apropiadamente, positiva o negativamente, por ejemplo en el primer caso uniendo a un dominio presente en el indicador de infección, pero no exclusivo de esa molécula, o en el segundo caso marcando una pareja de unión no unida en la fase sólida. Se dan a conocer también kits para realizar este método.

La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo clínico de vacuna de la gripe en el que se ensayaron muestras de 9 sujetos (personas 2 a 10) usando el método de fraccionamiento de linfocitos. La escala a la izquierda de cada gráfica de barras muestra la IgG H3N2 representada en ng frente a los días post-vacunación en la escala horizontal. Superpuesta a cada gráfico de barras, hay una línea de puntos que muestra el título de IH en la escala a la derecha para el virus A/Nanchong. Véanse los ejemplos 1 y 2 para detalles adicionales.

Ejemplo 1

Especificidad

Sujeto: Iniciales LOH, varón, 25 años. Muestra de sangre tomada 9 días después del primer día de enfermedad clínica pseudogripal clásica. Se había registrado una epidemia mixta de gripe A y B en la comunidad local.

Separación de linfocitos: Se recogió una muestra de sangre venosa heparinizada periférica. Se separaron los linfocitos mediante Lymphoprep® (Nycomed Pharma AS, Oslo) según las instrucciones del fabricante, excepto porque se mezcló la muestra de sangre heparinizada con un volumen doble (en lugar de igual) de disolución salina tamponada con fosfato (DSTF, pH 7,2) antes de la primera etapa de centrifugación. Se realizaron dos ciclos de lavado extra del sedimento celular. Se contaron los números de linfocitos en un hemocitómetro usando el método de exclusión por azul de dextrano.

Fraccionamiento de linfocitos: Se fraccionaron cantidades graduadas de linfocitos mediante el tampón de fraccionamiento Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) que contenía 0,5% de desoxicolato, pepstatina A 2 μ g/ml (Sigma P-4265, lote 18H0551), leupeptina 2 μ g/ml (Sigma L-0649, lote 77H86221), 0,5% de aprotinina (Sigma A-6279, lote 87H7010), PMSF 1 mM (Sigma P-7626, lote 48H1265) (basado en la referencia: Spector D.L., Goldman R.D., Leinwand L.A., "Cells. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1998, vol. 1: 74.6) y se sometieron a ensayo ELISA (véase la Tabla 1).

Recubrimiento y bloqueo de placas ELISA: Microplacas Greiner en forma plana de capacidad de unión media, nº de cat. 655001 (lote 98260148), D-72636 Frickenhausen, Alemania. Antígenos víricos (un obsequio de Solvay-Duphar, Holanda) para ensayo de anticuerpos de la gripe: antígenos de superficie A/Nanchang/933/95 (H3N2), 10 μ g/ml en DSTF, 100 μ l/pocillo. Antígenos de superficie B/Harbin/07/94, 10 μ g/ml en DSTF, 100 μ l/pocillo. Para ensayar anticuerpos IgG generales: IgG de cabra anti-humana (específica de cadena γ) Sigma I-7883 (lote 76H8895) usada a dilución 1:500 en DSTF, 100 μ l/pocillo. Recubrimiento durante una noche a 4°C. Bloqueo con DSTF con 10% de suero fetal bovino (SFB) durante 1 hora a temperatura ambiente. Entre todas las etapas posteriores, se lavaron las inmunoplaquetas 5 veces con DSTF con 0,05% de Tween 20.

Disposición en placa de las muestras: Se ensayaron los ensayos de anticuerpos IgG de la gripe y anticuerpos IgG en general en la misma inmunoplaqueta, así como patrones de IgG humana. Se ensayaron todas las muestras por duplicado.

ES 2 304 965 T3

Muestras de ensayo: Muestras para ensayar: "suero" de LOH (dilución 1:3 de plasma). Puro y diluciones de 10 veces en DSTF con 0,05% de Tween 20 y 5% de SFB (diluyente), 100 µl/pocillo. Patrón de IgG: Sigma I-4506 (lote 96H8840): 10 µg de IgG/ml, diluciones de 10 veces en DSTF con 0,05% de Tween 20 y 5% de SFB, 100 µl/pocillo.

- 5 El sedimento celular final de 300 µl estaba en una disolución de DSTF que contenía una dilución 1:9.368 de suero. Se añadieron a este sedimento 700 µl de DSTF (=dilución 1:3,33). El sedimento final tenía $2,0 \times 10^7$ células y contenía una contaminación sérica de 1:31.200. El sobrenadante final ensayado era equivalente a una dilución 1:9.370 del suero.

- 10 *Lisados celulares:* Se ajustaron los lisados para ser equivalentes a 800.000, 200.000 y 50.000 células/pocillo, 100 µl/pocillo.

TABLA 1

Mezcla de lisados celulares para ensayo

15	Número de células/pocillo	µl de sedimento celular	µl de tampón de fraccionamiento	µl de diluyente	µl suma	Dilución respecto al lavado celular final
20						
25	800.000	240	240	126	606	1: (2,53x3,33)
	200.000	60	60	486	606	1: (10,1x3,33)
30	50.000	15	15	576	606	1: (40,4x3,33)

La contaminación por anticuerpos séricos, respecto al lavado celular final, de las preparaciones celulares se calculó que era: 1:8,4 (10,6%) para 800.000 células, 1:33,7 (2,9%) para 200.000 células y 1:134,8 (0,7%) para 50.000 células. Todas las muestras de anticuerpo se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente.

- 35 *Anticuerpo secundario:* IgG de cabra anti-humana marcada con biotina (específica de cadena γ), Sigma B-1140 (lote 96H8886), usado a 1:500 en DSTF con 0,05% de Tween 20 y 5% de SFB, 100 µl/pocillo. Incubado durante 60 minutos a temperatura ambiente.

- 40 *Conjugado:* Conjugado de peroxidasa ExtrAvidin, Sigma E-2886 (lote 28H4824) diluido 1:1000 en DSTF con 0,05% de Tween 20 y 5% de SFB, 100 µl/pocillo. Incubado durante 60 minutos a temperatura ambiente.

- 45 *Desarrollo:* Comprimidos de sustrato (diclorhidrato de o-fenilendiamina), Sigma P-8287 (lote 88H8250). Se disolvió un comprimido (10 mg) en 25 ml de tampón fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0, y se complementó con 20 µl de perhidrol (30% de H₂O₂). Se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de sustrato y se detuvo la reacción después de 10 minutos con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 M. Se leyó la densidad óptica a 492 nm en un lector Titertek Multiskan PLUS (Flow Laboratories).

Resultados

- 50 Se basó la estimación de las cantidades de IgG en la interpolación de una curva patrón obtenida a partir de las diluciones de IgG patrón. Se ensayaron todas las muestras de ensayo por duplicado y se usó la media de lecturas de densidad óptica para los cálculos posteriores.

TABLA 2

55 *Anticuerpos IgG séricos*

60	Anticuerpos	Anticuerpos séricos (µg/ml)	%
	IgG general	2.365	100,0
65	Gripe B	70	3,0
	Gripe A	112	4,8

ES 2 304 965 T3

TABLA 3

Liberación de anticuerpos IgG de linfocitos fraccionados

Especi- ficidad	Número de linfo- citos en pocillo de 100 μl (10 ³)	IgG detec- tada en pocillo (ng)	Contamina- ción por IgG de sérica de células (ng)	IgG neta de linfo- citos en pocillo (ng)	IgG neta de cada linfo- cito (10 ⁻³ ng)
Gripe A	50	1,06	0,338/134,8= 2,5 x 10 ⁻³	1,06	2,12
	200	10,72	0,338/33,7= 10,0 x 10 ⁻³	10,71	5,35
Gripe B	200	0,38	Por debajo de detección	0,38	0,19
	800	1,29	Por debajo de detección	1,29	0,16
IgG general	50	13,29	10,6/134,8= 0,08	13,21	26,42
	200	44,6	10,6/33,7= 0,32	44,28	22,14

TABLA 4

Sumario: detección de IgG en linfocitos de sangre periférica y suero

Especificidad de anticuerpo	IgG neta de linfocitos en cada pocillo (10 ⁻⁵ ng)	%	IgG sérica μg/ml	%
Gripe A	3,74	1,54	112	4,8
Gripe B	0,18	0,7	70	3,0
IgG general	24,28	100,0	2.365	100,0

Conclusión: El sujeto LOH estaba infectado con el virus de la gripe A, como puede observarse claramente en la Tabla 3. Usando estos datos, puede suponerse que 100.000 linfocitos/pocillo deberían dar aproximadamente 20 ng/ml de anticuerpos IgG de gripe A, en contraposición con aproximadamente 2 ng/ml para anticuerpos de gripe B. La primera concentración de células dará, con fines prácticos, una señal ELISA para anticuerpos específicos de gripe A que puede medirse convenientemente, pero no para anticuerpos de la gripe B. Esto está en contraposición con los niveles de anticuerpos de la gripe medidos en suero (Tabla 2), en que los niveles de anticuerpos de gripe A y B son muy similares. Dichos anticuerpos séricos serían lo más probablemente anticuerpos reactivos cruzados preexistentes de exposiciones anteriores. Se ha conocido y demostrado durante muchos años que la memoria de la gripe puede reactivarse mediante exposiciones posteriores a virus heterólogos, el denominado “pecado antigénico original”, lo más probablemente mediante un efecto “presente” local en el tejido linfóide en el que tiene lugar el procesamiento inmunitario inicial.

Las razones por las que los anticuerpos de linfocitos fraccionados en este ensayo daban también una señal ELISA medible, aunque pequeña, con el antígeno de la gripe B, concretamente el virus que no ataca al sujeto LOH, podría ser la consecuencia de dicha reactivación no específica de los linfocitos de memoria como consecuencia del ataque inmunitario por el virus de la gripe A. Sin embargo, esta reactivación inusual de las células de memoria se cree que es un fenómeno relacionado con la gripe y no será relevante para otros agentes infecciosos. Por tanto, debe esperarse que se observe una distinción aún más clara entre las señales dadas por antígenos del agente infeccioso en cuestión y otros agentes.

El método actual requiere aproximadamente 100 μ l de sangre heparinizada (igual a 100.000 linfocitos) para cada anticuerpo específico de antígeno para ensayar, permitiendo el uso de muestras de sangre capilar.

Ejemplo 2

Cinética

Este es un ensayo clínico de vacuna de la gripe. Se incluyeron en el ensayo nueve sujetos sanos: 6 mujeres de 24-27 años de edad (media 26,2) y 3 hombres de 24-31 años (media 28,3). Fueron informados por el médico a cargo de las contraindicaciones relevantes para vacunación, y todos informaron al doctor que no conocían ninguna de dichas contraindicaciones. Ninguno se había vacunado contra la gripe anteriormente. Todos los vacunados completaron el ensayo y permitieron extraer muestras de sangre periférica como se describe a continuación. Se les dio a los sujetos vacuna vírica completa inactivada trivalente autorizada (Vaxigrip®) que contenía

Virus similar a A/Sydney/5/97 (H3N2) que contenía 15 μ g de hemaglutinina/dosis

Virus similar a A/Beijing/262/95 (H1N1) que contenía 15 μ g de hemaglutinina/dosis

Virus similar a B/Beijing/184/93 que contenía 15 μ g de hemaglutinina/dosis

de Mériex Sérums & Vaccines (Francia).

Se tomaron muestras de sangre heparinizada como se describe en el ejemplo 1. Todos los procedimientos fueron como se describen en el ejemplo 1, excepto porque los linfocitos se fraccionaron mediante congelación/descongelación (dos veces) insertando los viales de linfocitos en N₂ líquido y manteniendo bajo agua del grifo corriente.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH) con muestras de plasma tratadas con enzima destructora del receptor según procedimientos estándar (Kendal *et al.*, 1982, en “Concepts and Procedures for Laboratory-Based Influenza Surveillance”, Viral Disease Unit, OMS, Ginebra), usando 4 unidades de hemaglutinación del virus A/Nanchang y 0,7% de eritrocitos de pavo. Se ensayó el plasma en etapas de dilución doble y se apuntaron los títulos como la inversa de la mayor dilución que da una inhibición completa de la hemaglutinación vírica.

Se usaron muestras obtenidas el día de la vacunación, después de 7 días y después de 13 días.

Resultados

La Figura 1 muestra la cantidad (en ng) de IgG frente a antígenos de superficie del A/Nanchang/933/95 (H3N2) relacionado (véase el ejemplo 1) usando disoluciones obtenidas a partir de linfocitos fraccionados de 300 K para cada uno de los nueve sujetos vacunados (barras). Se clasifican según la cantidad de anticuerpos IgG específicos de la gripe obtenidos de los linfocitos fraccionados. La escala a la izquierda de ng de IgG no es la misma para todos los sujetos. Se muestran superpuestos los títulos de IH (línea de puntos) frente al virus A/Nanchang. Un título ≥ 40 se considera protector por consenso internacional.

Conclusión

Clásicamente, se considera que los anticuerpos IH son el “patrón oro” de los anticuerpos de la gripe, junto con los anticuerpos neutralizantes de virus. Los títulos de IH ≥ 40 se consideran protectores según el consenso internacional. La Figura 1 muestra que 4 de los 9 sujetos (personas 2, 5-7) obtuvieron dichos anticuerpos el día 7 y todos los

ES 2 304 965 T3

sujetos, excepto las personas 3 y 10, tenían dichos títulos de IH el día 13. Para todos los sujetos, había altos niveles de IgG específica de la gripe detectada en linfocitos fraccionados ya el día 7, y para 5 sujetos (personas 3, 4, 8-10), se detectaron el día 7 sólo anticuerpos de linfocitos fraccionados, y no niveles de anticuerpo IH protector.

Además, la especificidad de los anticuerpos IgG de la gripe era evidente por la aparición de dichos anticuerpos el día 7 y la desaparición de los mismos anticuerpos el día 13, puesto que el día 13 la mayoría de los sujetos tenían niveles significativos de anticuerpos séricos.

El ejemplo 2 enfatiza claramente que los anticuerpos detectados de linfocitos fraccionados no estaban contaminados con anticuerpos séricos atrapados en el sedimento linfocítico, como se demostraba claramente también en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

Método simplificado para purificar linfocitos de contaminantes séricos/plasmáticos

Típicamente, pueden separarse linfocitos suficientemente exentos de anticuerpos séricos/plasmáticos contaminantes mediante tres etapas sucesivas de centrifugación. Se mezclan 300 µl de sangre completa con 10 ml de diluyente consistente en 2 partes de DSTF y 1 parte de agua destilada. Se centrifuga la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente a 400 x g. Se desecha el sobrenadante y se añaden al sedimento 10 ml de DSTF. Se centrifuga la suspensión como anteriormente, y se repite el ciclo una vez. Se usa el sedimento final, suspendido en 100 µl de DSTF, como fuente de linfocitos para ensayos posteriores.

Ejemplo 4

Almacenamiento de sangre antes de la purificación de linfocitos

Se le dio a un sujeto varón (EJAa, 20 años) vacuna de la gripe trivalente inactivada autorizada según las instrucciones del fabricante (véase el ejemplo 2). Se tomaron muestras de 5 ml de sangre heparinizada el día de vacunación (día 0) y el día 9 después de la vacunación. Inmediatamente después de la recogida, se sometieron 300 µl de sangre a tres ciclos de lavado/centrifugación como se describe anteriormente en el ejemplo 3, y se fraccionaron los linfocitos como se describe en el ejemplo 1. Se almacenó la muestra de sangre restante a 4°C durante 4 días, seguido de almacenamiento a temperatura ambiente durante 4 horas antes de iniciar una nueva ronda de purificación de linfocitos. Se realizaron todos los ensayos ELISA posteriores como se describe en el ejemplo 1. Se hicieron los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IH) con las cepas de vacuna homólogas como se describe en el ejemplo 2.

TABLA 5

Almacenamiento de sangre a 4°C durante 4 días, seguido de 4 horas a temperatura ambiente. Efecto sobre la actividad de anticuerpo de linfocitos fraccionados

Días después de vacunación		H3N2		H1N1		B	
		Inme- diato	Después de 4 días	Inme- diato	Después de 4 días	Inme- diato	Después de 4 días
Día 0	IH	640		<10		<10	
	Células	704	598	058	060	224	210
Día 9	IH	640		20		40	
	Células	811	901	091	100	466	446

Todas las entradas son densidad óptica a 492 nm x 1000 y títulos de IH de anticuerpos plasmáticos. "Células" son anticuerpos de linfocitos fraccionados obtenidos a partir de 100 µl de sangre.

Resultados

Se había encontrado también que este sujeto tenía títulos de IH significativos contra el componente de vacuna A/Sydney/5/97 (H3N2) antes de la vacunación, y los anticuerpos liberados de linfocitos no aumentaron significativamente del día 0 al día 9, ni el título de IH. La respuesta de vacuna de IH ante el componente H1N1 A/Beijing/262/95 fue mala, y esto se observó también para el ensayo celular. La respuesta observada más claramente fue contra el componente de la gripe B B/Beijing/184/93, en que los títulos de IH subieron de <10 a 40. Esto se reflejó también para el ensayo celular.

Dejar la sangre a 4°C durante 4 días, seguido de 4 horas a temperatura ambiente, no afectó a la actividad de anticuerpo registrada de los linfocitos fraccionados. Los resultados inmediatos y aquellos obtenidos después de almacenamiento durante 4 días no variaron en ninguna medida significativa.

Otros experimentos han mostrado también que incluso después de 6 días en condiciones de almacenamiento similares (refrigeración interrumpida por 6 horas a temperatura ambiente), no se afectaba la medida consiguiente de anticuerpos de linfocitos fraccionados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de determinación de la presencia o cantidad de anticuerpo recién sintetizado en una muestra de sangre en respuesta a un inmunógeno que comprende:
detectar los anticuerpos liberados o partes de los mismos en una muestra que contiene linfocitos que se han fraccionado, con lo que se liberan los anticuerpos sintetizados o partes de los mismos asociados a dichos linfocitos, con lo que se determina la presencia o cantidad de anticuerpo recién sintetizado en dicha muestra de sangre, en el que dicha muestra que contiene linfocitos que se han fraccionado es dicha muestra de sangre o una preparación de linfocitos preparada a partir de dicha muestra de sangre,
en el que dicho anticuerpo recién sintetizado es un anticuerpo antigénicamente activo que se ha producido o sintetizado por y en una célula linfocítica en respuesta a la presencia de un inmunógeno *in vivo* como parte de una respuesta inmunitaria en curso.
15
2. Un método según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
fraccionar los linfocitos de dicha muestra que contiene linfocitos, con lo que se liberan los anticuerpos o partes de los mismos asociados a dichos linfocitos; y
detectar los anticuerpos liberados o partes de los mismos, con lo que se determina la presencia o cantidad de anticuerpo recién sintetizado en dicha muestra.
20
- 25 3. Un método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha muestra es sangre periférica.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra no se incuba para promover la síntesis y/o secreción de anticuerpos antes del método.
- 30 5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los linfocitos se fraccionan usando medios de fraccionamiento físico o tampones o disoluciones de fraccionamiento celular.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichos anticuerpos o partes de los mismos se detectan mediante la unión a uno o más antígenos que reconocen dichos anticuerpos o partes de los mismos.
- 35 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los anticuerpos liberados se detectan mediante un ensayo de unión en fase sólida.
8. Un método según la reivindicación 7, en el que dicha fase sólida porta uno o más antígenos (antígenos en fase sólida) reconocidos por el anticuerpo o anticuerpos o partes de los mismos para detectar (anticuerpos diana).
- 40 9. Un método según la reivindicación 7, en el que dicha fase sólida porta uno o más anticuerpos (anticuerpos en fase sólida) que reconocen el anticuerpo o anticuerpos o partes de los mismos para detectar (anticuerpos diana).
- 45 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el método se realiza en muestras de sangre de neonatos o lactantes para distinguir entre anticuerpos recién sintetizados y anticuerpos maternos transferidos pasivamente.
11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que antes del fraccionamiento de los linfocitos, o después del fraccionamiento pero antes de la etapa de detección, se almacena dicha muestra aproximadamente a 4°C o menos.
- 50 12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha muestra de sangre para uso en el método, o para preparar linfocitos para uso en el método, tiene un volumen de menos de 1 ml.
- 55 13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que se usan en el método los linfocitos directamente aislados de dicha muestra.
14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la etapa de detección se realiza mediante inmunoensayo, preferiblemente ELISA.
- 60 15. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 9 a 14, en el que se ponen en contacto con dicha fase sólida uno o más antígenos reconocidos por los anticuerpos diana inmovilizados sobre dicha fase sólida.
- 65 16. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en el que se ponen en contacto con dicha fase sólida uno o más anticuerpos que reconocen los anticuerpos diana inmovilizados sobre dicha fase sólida.

ES 2 304 965 T3

17. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que se usa un sustrato soluble para la etapa de detección y proporciona una señal espectrofotométricamente detectable.

18. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que se usa un antígeno de control negativo.

19. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18, en el que se emplean múltiples fases sólidas que portan cada una un antígeno diana diferente.

20. Un método de diagnóstico o monitorización de infección de un animal humano o no humano o parte de dicho animal mediante un inmunógeno, en el que dicho método comprende determinar en una muestra que contiene linfocitos de dicho animal la presencia o cantidad de anticuerpos recién sintetizados o partes de los mismos asociados a dichos linfocitos dirigidos a dicho inmunógeno según el método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, y determinar la presencia o extensión de la infección por dicho inmunógeno por referencia a muestras de control y/o referencia apropiadas.

21. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que dicho inmunógeno es un antígeno bacteriano o vírico y se determina el diagnóstico o monitorización de la infección por la bacteria o virus fuente.

22. Un método según la reivindicación 21, en el que dicho antígeno deriva de un virus seleccionado de la lista consistente en herpesvirus simple, citomegalovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y cualquiera de los virus de la hepatitis, así como *Toxoplasma* y virus de Epstein-Barr (EBV).

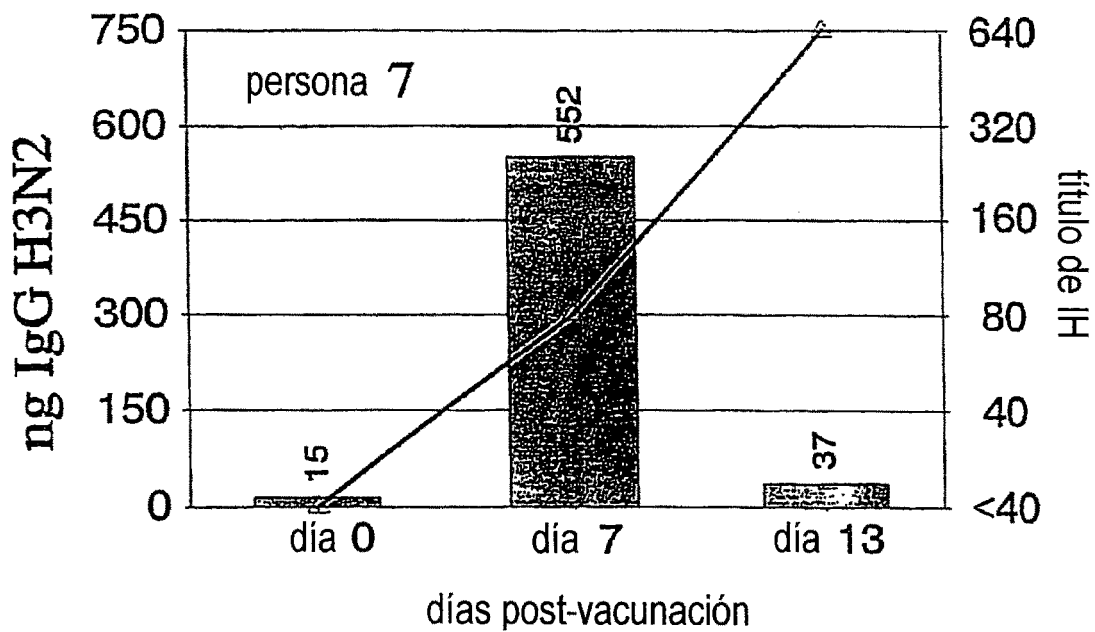
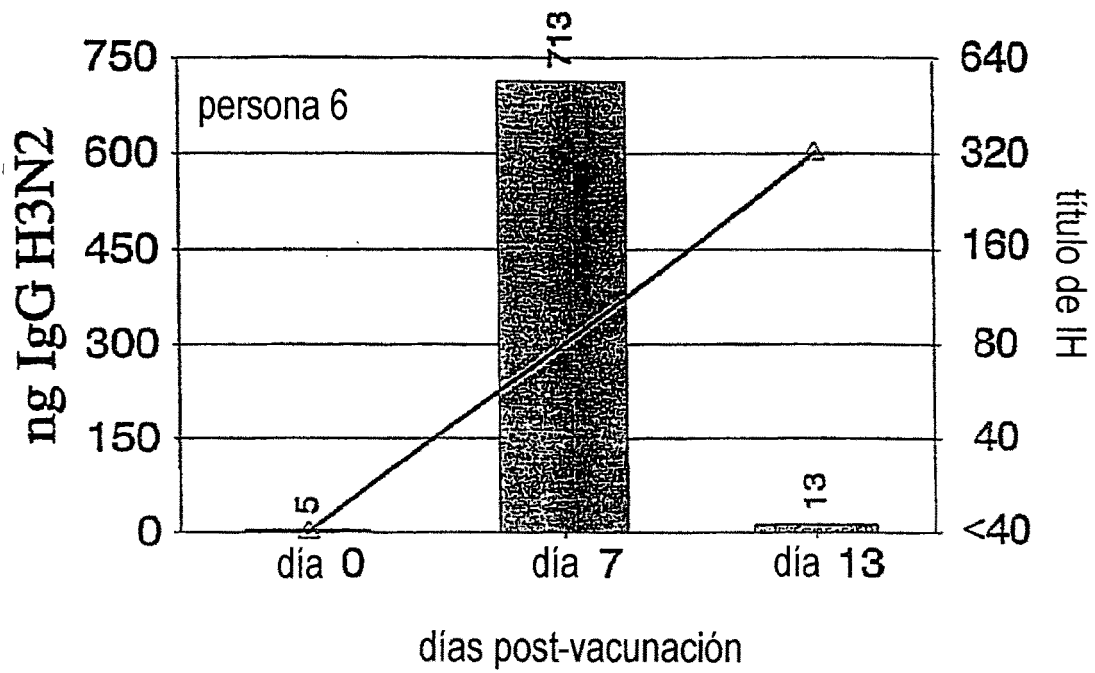


FIG 1

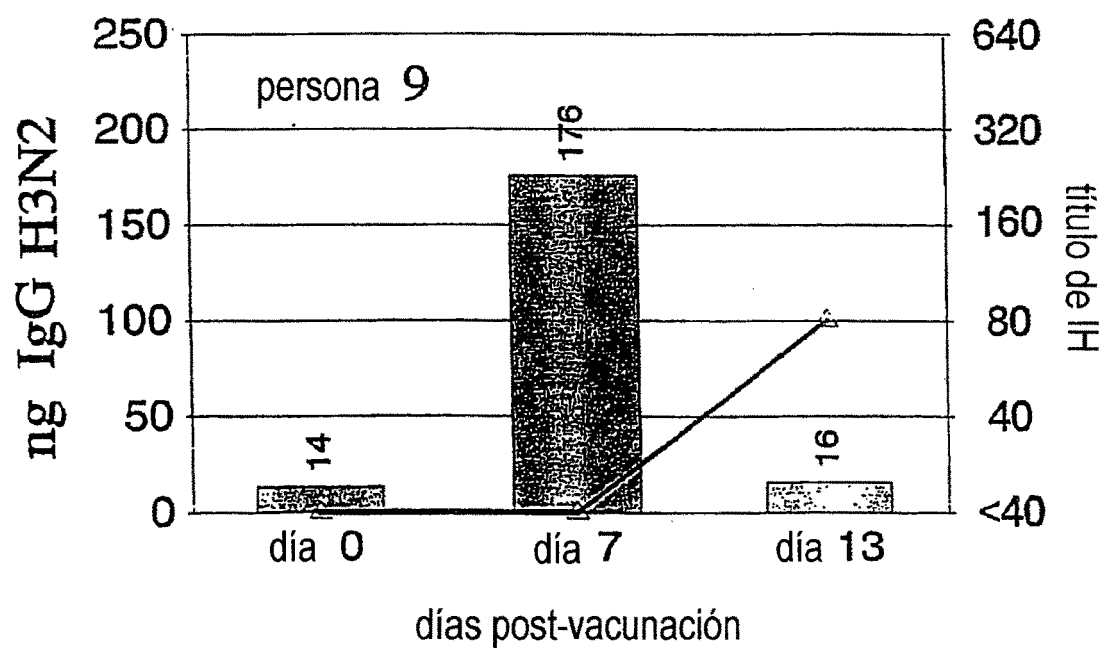
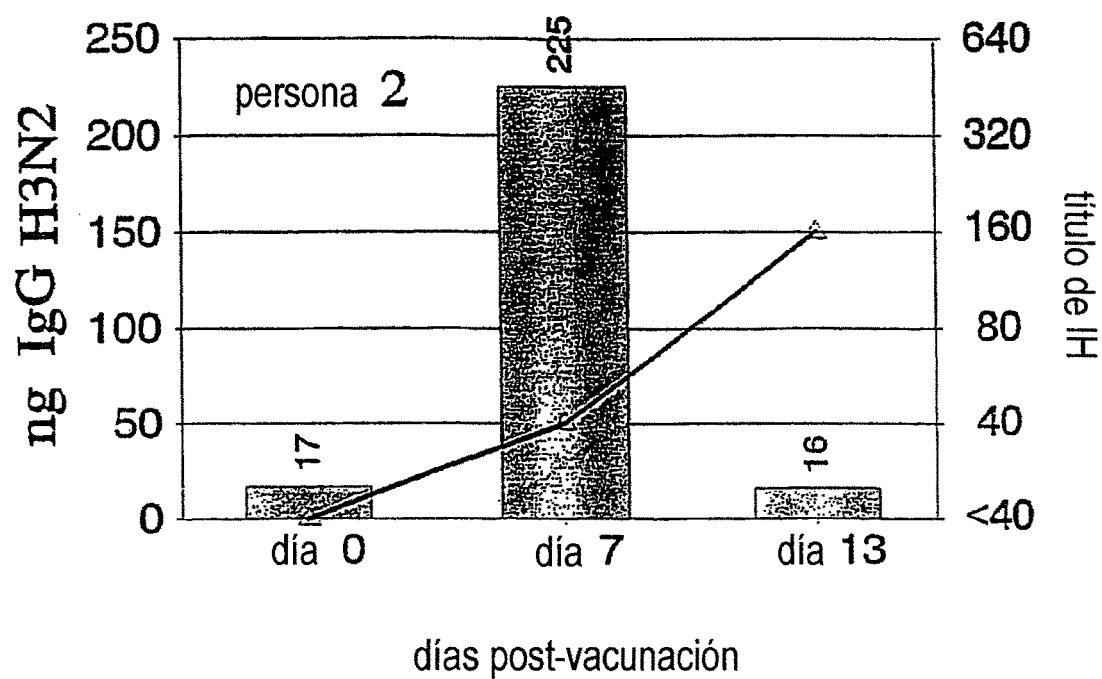


FIG 1 (Cont)

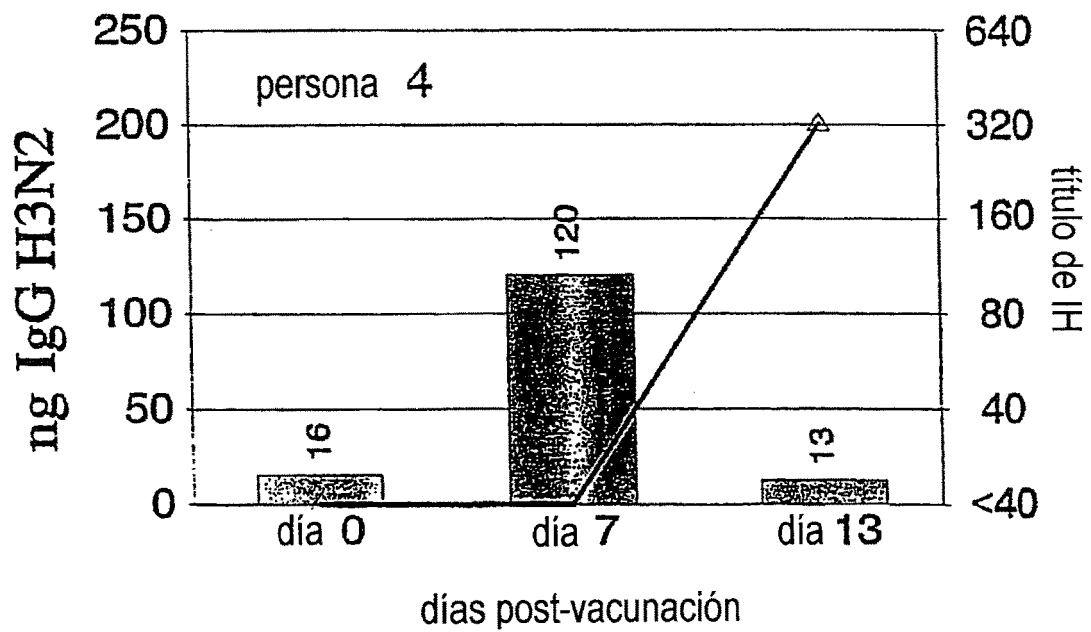
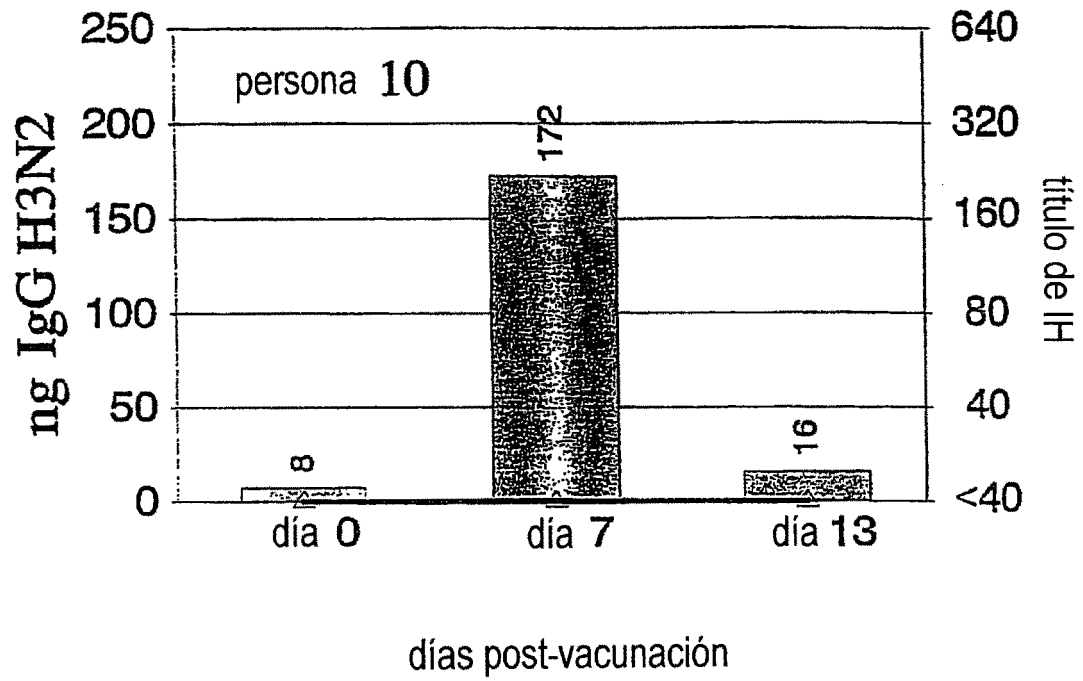


FIG 1 (Cont.)

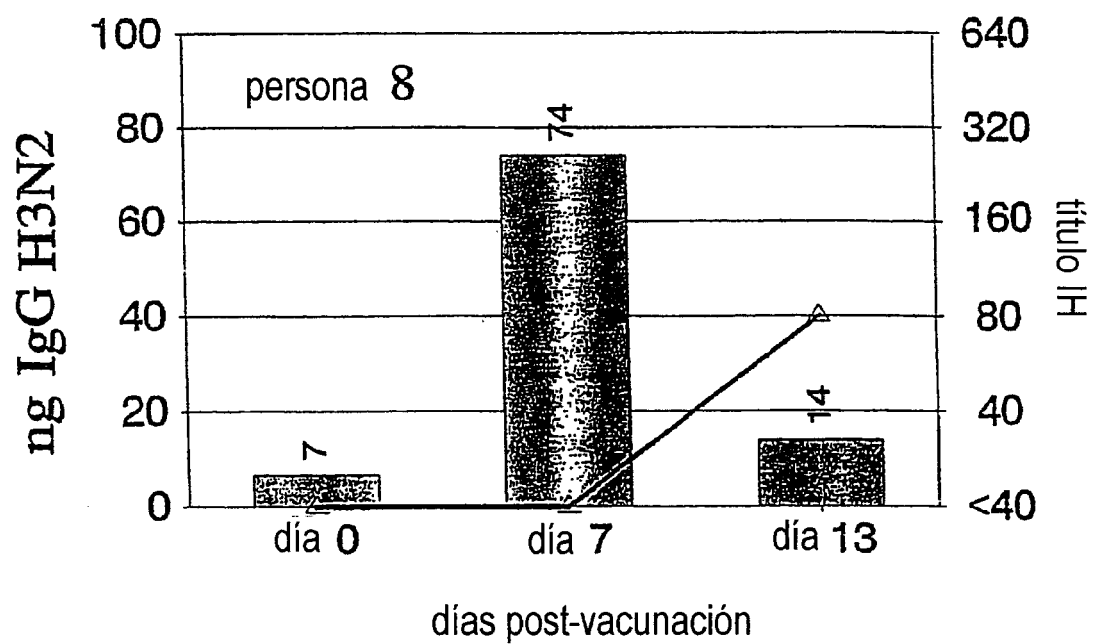
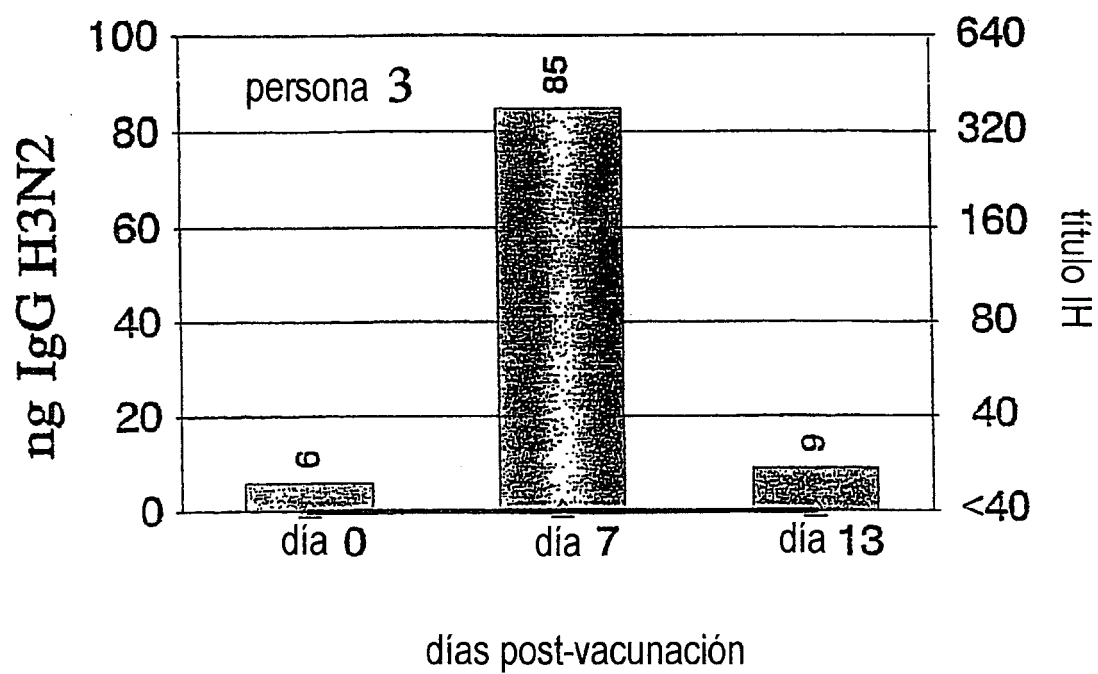


FIG 1 (Cont)

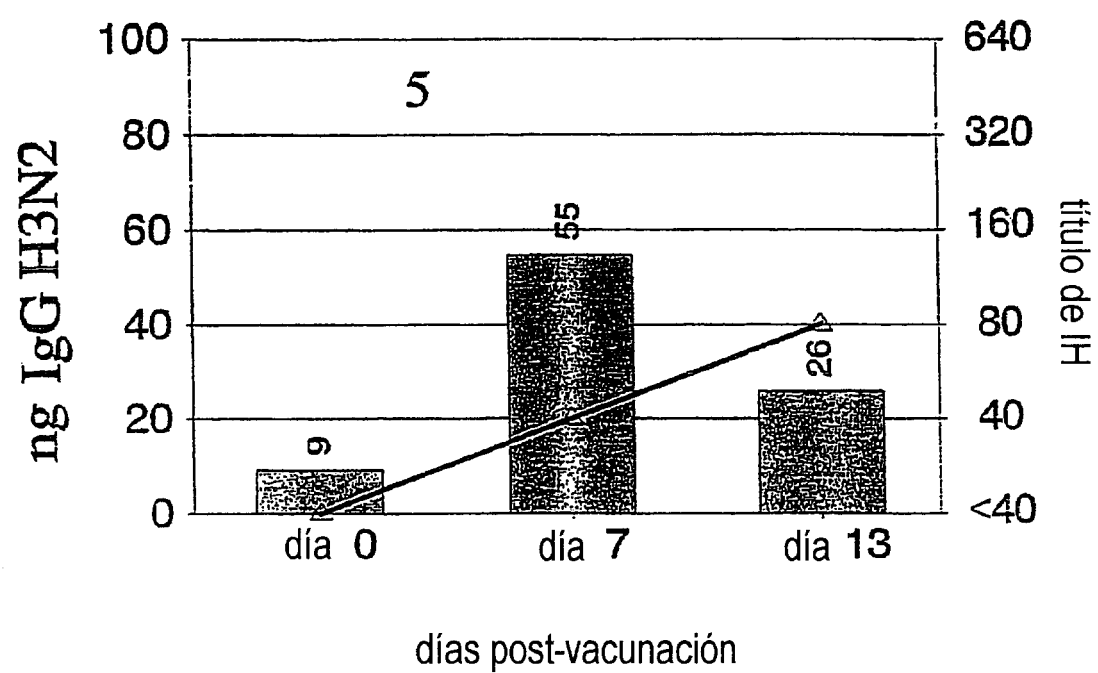


FIG 1 (Cont)