

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 232**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/689** (2008.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016 PCT/US2016/058031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017 WO17070422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016 E 16858264 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023 EP 3365459**

54 Título: **Métodos y dispositivos mejorados para un diagnóstico exacto de infecciones**

30 Prioridad:

**23.10.2015 US 201562245431 P**  
**02.02.2016 US 201615012897**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**26.07.2024**

73 Titular/es:

**RAPID PATHOGEN SCREENING, INC. (100.0%)**  
**2724 Loker Ave West**  
**Carlsbad, CA 02010, US**

72 Inventor/es:

**SAMBURSKY, ROBERT P.;**  
**VANDINE, ROBERT W. y**  
**BABU, UMA MAHESH**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la  
Oficina Europea de Patentes

ES 2 976 232 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 dispositivos mejorados para un diagnóstico exacto de infecciones

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La invención pertenece al campo de la identificación de infecciones virales y, más particularmente, al uso de los biomarcadores MxA, proteína C reactiva y/o procalcitonina para determinar con exactitud una infección viral y diferenciar la colonización de la infección activa.

Descripción de la técnica relacionada

15 La fiebre es una causa común de visitas infantiles a centros de atención de urgencia, tanto en consultorios de medicina familiar como de pediatría. Lo más común es que esto se relacione con una infección respiratoria o gastroenteritis. La alta incidencia de fiebre en niños y la administración cautelosa de antibióticos innecesarios son motivos para desarrollar una prueba de detección más exacta para detectar infecciones virales y/o bacterianas.

20 Diferenciar una infección bacteriana y una viral, así como también una infección activa de una colonización, suele ser un desafío, especialmente en niños pequeños que no pueden verbalizar sus síntomas y en el ámbito ambulatorio, donde el acceso a los diagnósticos de laboratorio es costoso, consume mucho tiempo y requiere varios días para producir un resultado. Diversos marcadores de diagnóstico son muy prometedores para diferenciar las infecciones virales de las bacterianas. Tres de estos marcadores incluyen las proteínas MxA (proteína A de resistencia a mixovirus), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP). La mayoría de las infecciones respiratorias se relacionan con faringitis, de las cuales el 40 % - 60 % son causadas por virus y el 10 - 30 % por estreptococos beta hemolíticos del grupo A. Otras infecciones respiratorias agudas incluyen sinusitis, otitis media, rinofaringitis, rinosinusitis, faringoamigdalitis, epiglotitis, laringitis, rinitis, bronquitis, bronquiolitis y neumonía.

30 La neumonía grave adquirida en la comunidad tiene como causa infecciones bacterianas en aproximadamente 60 % de los casos, y aproximadamente 10 % de los pacientes requieren ingreso en una unidad de cuidados intensivos (ICU). El 30 % restante se relaciona con virus respiratorios.

35 Aproximadamente 80 % de todos los antimicrobianos se recetan en atención primaria, y hasta 80 % de ellos son para indicaciones de las vías respiratorias. Las infecciones de las vías respiratorias son, con diferencia, la causa más común de tos en atención primaria. A menudo se recetan antibióticos de amplio espectro para la tos, que incluye la bronquitis aguda, y muchas de estas prescripciones beneficiarán a los pacientes solo marginalmente, si es que lo hacen, y pueden causar efectos secundarios y promover la resistencia a los antibióticos. Algunos de los factores que instan a los médicos a administrar antibióticos incluyen la ausencia de un marcador diagnóstico adecuado de infecciones bacterianas, la preocupación por la falta de seguimiento de los pacientes, y la presión del tiempo.

45 Las proteínas Mx son miembros de la superfamilia de GTPasas de alto peso molecular. En consecuencia, estas GTPasas se regulan positivamente por interferones (IFN) tipo I alfa/beta o tipo II. Las GTPasas Mx se expresan exclusivamente en células tratadas con IFN alfa/beta pero no en células tratadas con IFN gamma. Los interferones tipo I desempeñan funciones importantes en las respuestas inmunitarias innatas y tienen funciones inmunomoduladoras, antiproliferativas y antivirales. La MxA humana, una proteína de 78 kDa, se acumula en el citoplasma de las células tratadas con IFN  $\alpha/\beta$  e inhibe la replicación de una amplia gama de virus. La proteína MxA puede ofrecer ciertas ventajas como biomarcador de infección viral sobre otras proteínas inducidas tales como la 2', 5'-oligoadenilato sintetasa, debido a su menor concentración basal, su vida media más larga (2,3 días) y su rápida inducción. El ARNm de MxA es detectable en glóbulos blancos aislados de sangre periférica estimulados con IFN dentro de 1 a 2 h de la inducción de IFN, y la proteína MxA comienza a acumularse poco después.

50 Los estudios demostraron que la expresión de la proteína MxA en sangre periférica es un marcador sensible y específico de infección viral. Los niveles más altos de MxA en el grupo de infección viral en comparación con el grupo de infección bacteriana pueden explicarse por el hecho de que la proteína MxA es inducida exclusivamente por IFN tipo I y no por IFN-gamma, IL-1, TNF-alfa o cualquiera de las otras citocinas por infección bacteriana. Los niveles séricos de IFN tipo I se mantienen dentro de los límites normales, incluso en pacientes con infecciones bacterianas graves.

60 De manera similar, se informó que la mayoría de las infecciones virales causan poca respuesta de fase aguda, y se usaron concentraciones bajas de proteína C reactiva (CRP) para distinguir enfermedades de origen viral de aquellas de etiología bacteriana. Debido a que la concentración plasmática de proteína C reactiva aumenta rápidamente después de la estimulación y disminuye rápidamente con una vida media corta, la proteína C reactiva puede ser una herramienta muy útil en el diagnóstico y monitoreo de infecciones y enfermedades inflamatorias. En Escandinavia, las pruebas de proteína C reactiva en el lugar de atención son parte de la evaluación de rutina de pacientes con infecciones respiratorias en la práctica general, y su uso demostró ser rentable. En la práctica general, la proteína C

reactiva resulta valiosa en el diagnóstico de enfermedades bacterianas y en la diferenciación entre infecciones bacterianas y virales, aunque carece de especificidad. Diversos virus, tales como Influenza A y B, así como también el adenovirus, causan con frecuencia elevaciones en los niveles de CRP. A pesar de esta limitación, el valor diagnóstico de la proteína C reactiva es superior al de la velocidad de sedimentación globular (ESR) y superior o igual al del recuento de glóbulos blancos (WBC).

La procalcitonina es otro marcador de infección bacteriana. Si bien la procalcitonina no tiene actividad hormonal conocida, es un péptido de 116 aminoácidos precursor de la hormona calcitonina que participa en la homeostasis del calcio. Cuando un paciente está sano, la procalcitonina solo está presente en las células parafooliculares (células C) de la glándula tiroides y en las células neuroendocrinas del pulmón y el intestino. Sin embargo, si hay una infección bacteriana, se encuentra procalcitonina intacta en la sangre. El nivel de procalcitonina se relaciona con el estímulo proinflamatorio por la gravedad de la infección bacteriana y la sepsis. Los niveles de procalcitonina no aumentan significativamente en inflamaciones virales o no infecciosas. Curiosamente, los niveles elevados de procalcitonina producidos durante las infecciones no van seguidos de un aumento simultáneo de los niveles de calcitonina o una disminución de los niveles de calcio sérico. La procalcitonina se ha usado para identificar infecciones bacterianas; sin embargo, de manera similar a la proteína C reactiva, algunas infecciones virales tales como la Influenza A y B y los Adenovirus pueden causar elevaciones modestas en los niveles de procalcitonina.

Clínicamente, puede resultar complicado diferenciar ciertas infecciones virales y bacterianas sistémicas. Los cultivos bacterianos generalmente se realizan en casos de infección grave, tales como la neumonía, o cuando la consecuencia de omitir un diagnóstico puede provocar complicaciones graves, tales como la faringitis estreptocócica. Muchas veces, los cultivos son difíciles de obtener. Desafortunadamente, los cultivos virales no se realizan de forma rutinaria debido al importante retraso en la recepción de los resultados. Los paneles de PCR de detección viral son útiles, pero son costosos y no proporcionan información en el lugar de atención. Por lo tanto, aún existe la necesidad de pruebas de diagnóstico que sean capaces de identificar con seguridad infecciones virales y bacterianas, así como también de distinguir la infección activa del estado de colonización/portador, en un entorno de punto de atención.

Otro problema en la detección y el diagnóstico es que, a menudo, a pesar de las pruebas exhaustivas, los patógenos frecuentemente no se identifican. Numerosos estudios clínicos prospectivos utilizaron PCR para identificar virus respiratorios y bacterias atípicas, cultivos de células bacterianas y/o serología para identificar patógenos sospechosos. En estos estudios, no se identificó un patógeno en aproximadamente el 32-70 % de las URI (infecciones de las vías respiratorias superiores) y aproximadamente el 39-68 % de las LRTI (infecciones de las vías respiratorias inferiores).

En dos estudios de infecciones de las vías respiratorias superiores en adultos, el 32 % y el 67 %, respectivamente, de las infecciones no estaban microbiológicamente confirmadas (Huovinen y otros. *Pharyngitis in Adults: The Presence and Coexistence of Viruses and Bacterial Organisms* Ann Intern Med. 1989;110(8):612-616; Nicholson y otros. *Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, population based study of disease burden*. BMJ. 1997;315:1060-4, ambos incorporados en la presente descripción como referencia). En cuatro estudios de infecciones de las vías respiratorias superiores en adultos y niños, el 44 %, 20 %, 45 % y 60-70 %, respectivamente, de las infecciones no estaban microbiológicamente confirmadas (Melbye y otros. *The course of C-reactive protein response in untreated upper respiratory tract infection*, Br J Gen Pract. 2004 Septiembre;54(506):653-8; Leekha S y otros. *Viral detection using a multiplex polymerase chain reaction-based assay in outpatients with upper respiratory infection*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;75:169-73; Blaschke, *Interpreting assays for the detection of Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis. 2011 Mayo;52 Suplemento 4:5331-7; Stover y Litwin, *The Epidemiology of Upper Respiratory Infections at a Tertiary Care Center: Prevalence, Seasonality, and Clinical Symptoms*. Journal of Respiratory Medicine. Volumen 2014 (2014), ID del artículo 469393, 8 páginas).

Dos estudios pediátricos, uno para infecciones de las vías respiratorias superiores y otro para infecciones de las vías respiratorias inferiores, mostraron infección microbiológicamente no confirmada en el 63 % y el 40 % de los pacientes, respectivamente Chi y otros. *Etiology of acute pharyngitis in children: is antibiotic therapy needed?* J Microbiol Immunol Infect. 2003 Marzo;36(1):26-30; Drummond y otros. *Community acquired pneumonia-a prospective UK study*. Arch Dis Child. 2000 Noviembre;83(5):408-12). En siete estudios de adultos con infecciones de las vías respiratorias inferiores, el 50 %, 42 %, 68 %, 46 %, 45 %, 39 % y 47 %, respectivamente, de las infecciones no estaban microbiológicamente confirmadas (Oosterheert y otros. *Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection*. Clin Infect Dis. 2005 Noviembre 15; 41 (10): 1438-44; Jennings y otros. *Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults*. Thorax. 2008 Enero;63(1):42-8; Laing y otros. *Community-acquired pneumonia in Christchurch and Waikato 1999-2000: microbiology and epidemiology*. N Z Med J. 2001 Noviembre 9;114(1143):488-92; Musher DM y otros. *Can an etiologic agent be identified in adults who are hospitalized for community-acquired pneumonia: results of a one-year study*. J Infect. 2013 Julio;67(1):11-8; Bierbaum y otros. *Performance of a novel microarray multiplex PCR for the detection of 23 respiratory pathogens (SYMP-ARI study)*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:2851-61; van Gageldonk-Lafeber y otros. *The aetiology of community-acquired pneumonia and implications for patient management*. Neth J Med. 2013;71:418-25; Falsey AR y otros. *Bacterial complications of respiratory tract viral illness: a comprehensive evaluation*. J Infect Dis. 2013 Agosto 1;208(3):432-41).

Resumen de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas. Los dispositivos y métodos de diagnóstico y detección comprueban la presencia de marcadores de respuesta inmune para infección viral y marcadores de respuesta inmune para infección bacteriana, para ayudar de manera efectiva en la identificación de la presencia de una infección clínicamente significativa, ayudar en la diferenciación de infecciones virales y bacterianas y para distinguir el estado de colonización/portador de la infección activa.

Un método para diferenciar entre el estado de colonización/portador e infección activa incluye la etapa de realizar una prueba para detectar la presencia de bacterias y/o virus en una muestra. Esta primera prueba puede incluir, pero no se limita a, PCR, cultivo viral, IFA viral o bacteriano, prueba de antígeno viral, prueba de antígeno bacteriano, o un cultivo bacteriano. Si la muestra es positiva para un patógeno típico (viral o bacteriano), se realiza una segunda prueba para confirmar la existencia de una infección auténtica. La confirmación bacteriana en presencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml a 0,015 ng/ml de procalcitonina y/o una presencia de al menos aproximadamente 15 mg/l a 20 mg/l de proteína C reactiva representa una infección verdadera y no un estado de portador o colonización. Si se confirma la presencia de un virus en la muestra original, se realiza una tercera prueba para detectar la presencia de la media más 2-3,5 veces la desviación estándar de los valores iniciales de la población normal del biomarcador viral, o al menos de aproximadamente 25 ng/ml a 35 ng/ml de MxA en dependencia del estándar de referencia. Una presencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica una infección viral activa. La ausencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica una ausencia de una infección viral auténtica y representa el estado de portador o colonización. En otras modalidades, se realizan pruebas solo para bacterias o solo para virus. Los biomarcadores pueden ser cualitativos y establecerse con umbrales en el valor de corte o proporcionar resultados cuantitativos o una combinación de resultados cualitativos o cuantitativos.

Un método para diferenciar entre estado de portador/colonización y una infección activa incluye la etapa de determinar la presencia de un patógeno viral o bacteriano mediante la utilización de pruebas de antígenos, pruebas moleculares y/o cultivo celular en combinación con confirmación serológica de una respuesta sistémica mediante una elevación en MxA, CRP, procalcitonina o cualquier otro biomarcador bacteriano específico. Otros biomarcadores potenciales incluyen, pero no se limitan a amiloide A sérico, IL-6 (interleucina-6), IFIT o lipocalina de neutrófilos humanos (HNL).

En otros casos, MxA, procalcitonina y/o proteína C reactiva se usan para distinguir entre infección bacteriana, infección viral y estado de portador/colonización. En algunos casos, estos marcadores de respuesta inmune se usan para diagnosticar pacientes con una enfermedad que no se confirmó microbiológicamente con los métodos de laboratorio estándar (por ejemplo, PCR, cultivo y radiografía).

En algunas situaciones, después de que se realizaron pruebas estándar para determinar la infección (que incluyen pruebas que usan MxA, proteína C reactiva y/o procalcitonina) y la causa de la enfermedad de un paciente aún no se confirma microbiológicamente, se toman medidas adicionales para tratar de determinar una diagnóstico. El uso de MxA en combinación con proteína C reactiva o procalcitonina, u otro marcador bacteriano serológico, ayuda a confirmar la presencia de una infección clínicamente significativa a partir de una infección insignificante que no requiere tratamiento inmediato.

En algunos casos preferidos, se analiza una primera muestra para detectar la presencia elevada de MxA, proteína C reactiva y/o procalcitonina. Si estos ensayos dan un resultado negativo, se toma una segunda muestra del paciente dentro de cuatro a setenta y dos horas (preferentemente, dentro de las 48 horas) de la muestra inicial, y se analiza por segunda vez para detectar la presencia elevada de MxA, proteína C reactiva y/o procalcitonina. En algunos de estos casos, la primera y la segunda muestra se comprueban para detectar MxA, y la segunda muestra se toma entre cuatro y cuarenta y ocho horas después de la primera muestra. En otros casos, la primera muestra y la segunda muestra se analizan para detectar MxA y proteína C reactiva o procalcitonina. La segunda muestra se toma entre cuatro y cuarenta y ocho horas después de la primera muestra. Opcionalmente, se realizan investigaciones y pruebas adicionales para tratar de determinar si un paciente con un diagnóstico microbiológicamente no confirmado tiene una enfermedad emergente.

Un método para determinar si una infección es bacteriana y/o viral incluye la etapa de determinar la presencia de MxA, proteína C reactiva (CRP) y procalcitonina (PCT) en una muestra. Pueden adicionarse al ensayo uno o más niveles adicionales de CRP de 80 mg/ml - 100 mg/ml o PCT entre 0,25 ng/ml y 1,0 ng/ml para determinar la intensidad o gravedad de la infección bacteriana.

Como se describe en la presente descripción, un único dispositivo multiparamétrico comprueba la presencia de MxA, un nivel bajo de proteína C reactiva, un nivel alto de proteína C reactiva y procalcitonina en una muestra o comprueba la presencia de MxA y procalcitonina en una muestra.

Un método examina a un paciente con una infección respiratoria para detectar colonización bacteriana. Se realiza una primera prueba para detectar la presencia de bacterias. Si la primera prueba indica que hay bacterias presentes, se realiza una segunda prueba para determinar cuantitativamente el nivel de procalcitonina o proteína C reactiva en una muestra del paciente. Una muestra de paciente que da positivo para bacterias atípicas mediante el uso de PCR en la primera prueba y un nivel de procalcitonina en una muestra de paciente que es inferior a 0,1 ng/ml o un nivel de proteína C reactiva en la muestra de paciente que es inferior a 20 mg/l indica negativo para infección. Un resultado de

cultivo celular superior a  $1 \times 10^6$  CFU/ml de bacterias atípicas en la primera prueba y un nivel de procalcitonina inferior a 0,15 ng/ml indica colonización. Un resultado de cultivo celular superior a  $1 \times 10^6$  CFU/ml de bacterias atípicas en la primera prueba, un nivel de procalcitonina superior o igual a 0,15 ng/ml e inferior a 0,25 ng/ml, un recuento de glóbulos blancos inferior a 12 000, y ninguna banda indica colonización. Un resultado de cultivo celular superior a  $1 \times 10^6$  CFU/ml de bacterias atípicas en la primera prueba y un nivel de proteína C reactiva inferior a 20 mg/l indica colonización. Un resultado de cultivo celular superior a  $1 \times 10^6$  CFU/ml de bacterias atípicas en la primera prueba, un nivel de proteína C reactiva superior o igual a 20 mg/l e inferior a 80 mg/l, un recuento de glóbulos blancos inferior a 12 000, y la ausencia de bandas también indica colonización. Si el paciente da positivo para estreptococo A o estreptococo C mediante el uso de cultivo celular y un nivel de procalcitonina es inferior a 0,1 ng/ml o un nivel de proteína C reactiva es inferior a 20 mg/l, el método comprueba el anticuerpo contra estreptolisina O y un recuento de glóbulos blancos. Un anticuerpo contra estreptolisina O inferior al 80 % y un recuento de glóbulos blancos inferior a 12 000 indican colonización. La serología emparejada negativa también indica colonización.

Un método para detectar colonización en un paciente con una infección respiratoria incluye la etapa de realizar una primera prueba para detectar la presencia de una infección bacteriana o viral. Si la primera prueba es positiva para detectar la presencia de un virus, se realiza una segunda prueba para determinar el nivel de MxA en una muestra del paciente. Un nivel de MxA en la muestra del paciente superior o igual a 25 ng/ml indica una infección viral y un nivel de MxA en la muestra del paciente inferior a 25 ng/ml indica que no hay respuesta sistémica del hospedero. El método también puede incluir una tercera prueba para detectar la presencia de bacterias. Si la tercera prueba indica que hay bacterias presentes, se realiza una cuarta prueba para determinar el nivel de procalcitonina o proteína C reactiva en una muestra del paciente. Una muestra del paciente que da positivo para bacterias atípicas mediante el uso de PCR en la tercera prueba y un nivel de procalcitonina en una muestra del paciente inferior a 0,1 ng/ml o un nivel de proteína C reactiva en la muestra del paciente que es inferior a 20 mg/l indica negativo para infección. Un resultado de cultivo celular superior a  $1 \times 10^6$  CFU/ml de bacterias atípicas en la tercera prueba y un nivel de procalcitonina inferior a 0,15 ng/ml indica colonización. Un resultado de cultivo celular superior a  $1 \times 10^6$  CFU/ml de bacterias atípicas en la tercera prueba, un nivel de procalcitonina superior o igual a 0,15 ng/ml y menor a 0,25 ng/ml, un recuento de glóbulos blancos menor a 12 000, y ninguna banda indica colonización. Un resultado de cultivo celular superior a  $1 \times 10^6$  CFU/ml de bacterias atípicas en la tercera prueba y un nivel de proteína C reactiva inferior a 20 mg/l indica colonización. Un resultado de cultivo celular superior a  $1 \times 10^6$  CFU/ml de bacterias atípicas en la tercera prueba, un nivel de proteína C reactiva superior o igual a 20 mg/l e inferior a 80 mg/l, un recuento de glóbulos blancos inferior a 12 000, y la ausencia de bandas también indica colonización. Si el paciente da positivo para estreptococo A o estreptococo C mediante el uso de cultivo celular y un nivel de procalcitonina es inferior a 0,1 ng/ml o un nivel de proteína C reactiva es inferior a 20 mg/l, se analiza una muestra para detectar anticuerpos contra estreptolisina O y un recuento de glóbulos blancos. Un anticuerpo contra estreptolisina O inferior al 80 % y un recuento de glóbulos blancos inferior a 12 000 indican colonización y la serología emparejada negativa también indica colonización.

Un método incluye la etapa de analizar una muestra de paciente para detectar MxA. Si la muestra del paciente tiene un nivel de MxA superior o igual a 25 ng/ml, se diagnostica al paciente una infección viral, independientemente de los niveles elevados de al menos un biomarcador bacteriano del hospedero en la muestra.

Un método para diferenciar entre colonización e infección activa incluye la etapa de realizar al menos una primera prueba para detectar la presencia de bacterias o virus en una muestra. Si la muestra es positiva para bacterias, se realiza una segunda prueba para detectar la presencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina y/o una presencia de al menos aproximadamente 20 mg/l de proteína C reactiva. Una presencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina o al menos aproximadamente 20 mg/l de proteína C reactiva indica una infección bacteriana activa. Una ausencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina o al menos aproximadamente 20 mg/l de proteína C reactiva indica colonización bacteriana. Si la muestra es positiva para el virus, se realiza una tercera prueba para detectar una presencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA. La presencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica una infección viral activa. Una ausencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica colonización viral.

Un método para diferenciar entre colonización e infección activa incluye la etapa de realizar al menos una primera prueba para detectar la presencia de bacterias en una muestra. Si la muestra es positiva para bacterias, se realiza una segunda prueba para determinar la presencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina y/o una presencia de al menos aproximadamente 20 mg/l de proteína C reactiva. Una presencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina o al menos aproximadamente 20 mg/l indica una infección bacteriana activa. Una ausencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina o al menos aproximadamente 20 mg/l de proteína C reactiva indica colonización bacteriana.

Un método para diferenciar entre colonización e infección activa incluye la etapa de realizar al menos una primera prueba para detectar la presencia de virus en una muestra. Si la muestra es positiva para el virus, se realiza una segunda prueba para determinar la presencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA. Una presencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica una infección viral activa y una ausencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica colonización viral.

La presencia de MxA y procalcitonina en una muestra puede determinarse mediante el uso de un único dispositivo de ensayo multiparamétrico que analiza la presencia tanto de MxA como de procalcitonina.

#### Breve descripción de las figuras

- 5
- Figura 1 muestra un método clínico para el diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias superiores.  
 Figura 2 muestra un método clínico para el diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores.  
 Figura 3 muestra un método novedoso para diagnosticar infecciones de las vías respiratorias superiores e identificar la colonización.
- 10
- Figura 4 muestra un método novedoso para diagnosticar infecciones de las vías respiratorias inferiores e identificar la colonización.  
 Las Figuras 5A-5L muestran diagnósticos para pacientes en un ensayo clínico mediante el uso de los métodos de diagnóstico descritos en la presente descripción.
- 15
- Figura 6 muestra las bacterias identificadas en un ensayo clínico.  
 Figura 7 muestra las bacterias identificadas mediante el uso de uno de los nuevos métodos descritos en la presente descripción.  
 Figura 8 muestra los resultados de la prueba visual de ventana de prueba de detección rápida para distinguir infecciones virales y bacterianas y una interpretación de esos resultados.
- 20
- Figura 9A muestra un dispositivo con una línea de prueba correspondiente a la presencia de un marcador viral y una segunda línea de prueba separada que detecta la presencia de un marcador bacteriano en una modalidad de la presente invención.  
 Figura 9B muestra un dispositivo con la zona de reactivo aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, y una línea de prueba correspondiente a la presencia de un marcador viral y una segunda línea de prueba separada que detecta la presencia de un marcador bacteriano en una modalidad de la presente invención.
- 25
- Figura 10A muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis ubicada entre una zona de aplicación de muestra y una zona de reactivo.  
 Figura 10B muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que tiene solapamiento con una zona de aplicación de muestras.
- 30
- Figura 10C muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que tiene solapamiento con una zona de reactivo.  
 Figura 10D muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que tiene solapamiento con una zona de aplicación de muestra y una zona de reactivo.
- 35
- Figura 11A muestra un dispositivo con una línea de prueba correspondiente a la presencia de un marcador bacteriano, tales como niveles elevados de proteína C reactiva.  
 Figura 11B muestra un dispositivo con la zona de reactivo aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra y una línea de prueba correspondiente a la presencia de un marcador bacteriano tal como niveles altos de proteína C reactiva.
- 40
- Figura 12A muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis ubicada entre una zona de aplicación de muestra y una zona de reactivo.  
 Figura 12B muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que tiene solapamiento con una zona de aplicación de muestras.  
 Figura 12C muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que tiene solapamiento con una zona de reactivo.
- 45
- Figura 12D muestra un dispositivo de análisis de muestras que incluye una zona de lisis que tiene solapamiento con una zona de aplicación de muestra y una zona de reactivo.  
 Figura 13A muestra un dispositivo de análisis de muestras completamente abierto con tiras reactivas duales, así como también una zona de conjugado y una zona de aplicación de muestra en un compresor de muestra en un plano separado de las tiras reactivas.
- 50
- Figura 13B muestra el dispositivo de análisis de muestras de la Figura 13A con parte de la carcasa cerrada, pero la zona de conjugado aún visible en el lado izquierdo del dispositivo.  
 Figura 13C muestra el dispositivo de análisis de muestras de la Figura 13A después de que se inició la prueba.
- 55
- Figura 14A muestra un resultado de prueba negativo tanto para MxA como para proteína C reactiva (baja y alta) en una modalidad de la presente invención.  
 Figura 14B muestra un resultado positivo para MxA, lo que indica una infección viral.  
 Figura 14C muestra un resultado positivo para MxA y CRP baja, lo que indica una infección viral.  
 Figura 14D muestra un resultado positivo para CRP baja.  
 Figura 14E muestra un resultado positivo tanto para CRP baja como alta, en tiras separadas.
- 60
- Figura 14F muestra un resultado positivo tanto para CRP (baja y alta) como para MxA, lo que indica una infección viral (o posible coinfección).  
 Figura 15A muestra un dispositivo de análisis de muestras completamente abierto con tiras reactivas duales y una zona de conjugado en un compresor de muestra en un plano separado de las tiras reactivas.
- 65
- Figura 15B muestra el dispositivo de análisis de muestras de la Figura 15A con parte de la carcasa cerrada, pero la zona de conjugado aún es visible en el lado izquierdo del dispositivo.

- Figura 15C muestra el dispositivo de análisis de muestras de la Figura 15A después de que se inició la prueba.
- Figura 16 muestra un kit para análisis de muestras mediante el uso de un dispositivo de análisis de muestras.
- 5 Figura 17 muestra un dispositivo de análisis de muestras con tiras reactivas dobles.
- Figura 18 muestra un método para confirmar si una infección de las vías respiratorias superiores sospechada, pero no confirmada microbiológicamente, es bacteriana o viral.
- Figura 19 muestra un método para confirmar si una infección de las vías respiratorias inferiores sospechada, pero no confirmada microbiológicamente, es bacteriana o viral.
- 10 Figura 20 muestra un método para confirmar la infección bacteriana en pacientes microbiológicamente no confirmados.
- Figura 21 muestra la etiología infecciosa de los pacientes en un estudio.
- Figura 22 muestra una curva receptor-operador de proteína C reactiva y su desplazamiento tras la adición de MxA.
- 15 Figura 23 muestra una curva receptor-operador de procalcitonina y su desplazamiento tras la adición de MxA.

#### Descripción detallada de la invención

- 20 Los desafíos en la diferenciación clínica de las infecciones respiratorias virales y/o bacterianas conducen a la apropiación indebida de antibióticos y al aumento de los costos de atención médica. Se necesita una herramienta para facilitar una diferenciación rápida y exacta en los puntos de atención.

- 25 Los métodos descritos en la presente descripción, que analizan MxA, proteínas IFIT, otros marcadores virales del hospedero, proteína C reactiva, procalcitonina y/u otros marcadores bacterianos del hospedero, pueden usarse en cualquier plataforma de prueba. Otros posibles biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, amilasa A sérica o lipocalina de neutrófilos humanos (HNL). Algunos ejemplos de dispositivos incluyen, pero no se limitan a, dispositivos de flujo lateral, ELISA, fluorescencia o quimioluminiscencia. Los resultados pueden ser cualitativos o cuantitativos o una de sus combinaciones. La prueba puede representar un formato desechable de un solo uso o un analizador portátil o de escritorio. Otros ejemplos también se describen en la presente descripción.
- 30

- La presente invención proporciona métodos para diferenciar entre infecciones virales y bacterianas. En lugar de analizar analitos específicos de una infección bacteriana o viral particular, los ensayos y métodos descritos en la presente descripción analizan marcadores de diagnóstico que se producen específicamente en un hospedero en respuesta a una infección bacteriana general no especificada y a una infección viral general no especificada. Los marcadores de diagnóstico son, preferentemente, marcadores de una enfermedad no especificada y/o desconocida de origen bacteriano o viral. En modalidades preferidas, los marcadores de diagnóstico son marcadores específicos para una respuesta inmune a una infección bacteriana y/o viral no especificada y/o desconocida.
- 35

- 40 Los métodos en la presente descripción también pueden distinguir entre colonización e infección activa. Fue inesperado que alguien pueda tener una infección activa y ser asintomático. Por el contrario, es posible que una persona sintomática no tenga una infección activa.

- 45 Como se describe en la presente descripción, "colonización" o un "estado de portador" se refieren a una infección local clínicamente insignificante sin una respuesta inmune o serológica sistémica asociada. Estos dos términos se usarán indistintamente en la presente descripción.

- Un dispositivo de diagnóstico multiplexado prueba marcadores de infección viral y bacteriana y puede identificar efectivamente infecciones clínicamente significativas mediante la selección de un umbral significativamente por encima de los valores iniciales observados en la población normal y con base en los valores relativos de los biomarcadores, y puede ayudar en la rápida diferenciación entre infecciones virales y bacterianas y/o entre infección activa y colonización, por ejemplo en la consulta ambulatoria o durante una visita de atención de urgencia. Esta capacidad puede reducir drásticamente los costos de atención médica al limitar los diagnósticos erróneos y el subsecuente uso excesivo de antibióticos. Esta práctica puede limitar las alergias a los antibióticos, los eventos adversos y la resistencia a los antibióticos.
- 50
- 55

- Los métodos y dispositivos descritos en la presente descripción prueban la presencia de MxA, proteína C reactiva (preferentemente, un primer nivel y un segundo nivel, donde el segundo nivel de proteína C reactiva es mayor que el primer nivel de proteína C reactiva pero, alternativamente, uno puede analizarse el nivel de proteína C reactiva) y/o procalcitonina u otro biomarcador bacteriano. Las pruebas de esta combinación única de marcadores de respuesta inmune virales (MxA) y bacterianas (proteína C reactiva y procalcitonina) permiten un diagnóstico mucho más exacto de un paciente.
- 60

- La combinación de MxA, interferón, o IFIT en presencia de proteína C reactiva, procalcitonina u otro biomarcador bacteriano desplaza la curva del operador receptor para permitir el uso de umbrales de sensibilidad más altos para la confirmación de la infección bacteriana porque la especificidad del biomarcador bacteriano es potenciado por la
- 65

presencia del marcador viral. Por lo tanto, si un paciente tiene un marcador viral elevado en presencia de proteína C reactiva y/o procalcitonina u otros biomarcadores bacterianos elevados, se confirma una infección viral, pero una elevación de los marcadores bacterianos independientes de los marcadores virales confirmaría una infección bacteriana. Sin la presencia de biomarcadores virales, el límite para la determinación de la infección bacteriana debería establecerse mucho más alto para generar una mayor especificidad a costa de la sensibilidad. Esta combinación de biomarcadores mejora drásticamente la sensibilidad bacteriana al cambiar las curvas del operador receptor a favor de límites de sensibilidad más altos.

En algunas modalidades preferidas, un dispositivo de análisis de muestra de diagnóstico único combinado analiza la presencia de MxA, un nivel bajo de proteína C reactiva, un nivel alto de proteína C reactiva y procalcitonina. En otras modalidades preferidas, un primer dispositivo de diagnóstico combinado prueba la presencia de dos o más de MxA, un nivel bajo de proteína C reactiva, un nivel alto de proteína C reactiva o procalcitonina y uno o más dispositivos de diagnóstico adicionales prueban una presencia de al menos uno de MxA, un nivel bajo de proteína C reactiva, un nivel alto de proteína C reactiva o procalcitonina. En otra modalidad preferida, un primer dispositivo de análisis de muestras de diagnóstico combinado analiza la presencia de MxA, un nivel bajo de proteína C reactiva y un nivel alto de proteína C reactiva, y un segundo dispositivo de análisis de muestras analiza la presencia de procalcitonina. En otra modalidad más, diferentes dispositivos prueban cada uno de MxA, un nivel bajo de proteína C reactiva, un nivel alto de proteína C reactiva y procalcitonina.

En algunas modalidades, la obtención de resultados para dos niveles de proteína C reactiva diferencia entre una infección bacteriana no agresiva que necesita antibióticos orales apropiados (resultado positivo para un nivel bajo de proteína C reactiva solo en el intervalo de 20 mg/l) frente a una infección agresiva, infección bacteriana grave que necesita una intervención terapéutica agresiva tal como antibióticos intravenosos u otras intervenciones más drásticas (resultado positivo tanto para el nivel bajo como para el nivel alto de proteína C reactiva en el intervalo superior a 80 mg/l). La presencia de una segunda línea de corte más alta también puede ayudar a identificar a los pacientes con mayor probabilidad de requerir ingreso hospitalario. Los niveles elevados de proteína C reactiva ayudan a determinar la agresividad o la importancia clínica de una infección bacteriana debido al aspecto semicuantitativo de la prueba.

Algunos ejemplos de formatos de ensayo para determinar la presencia de proteína C reactiva, MxA y/o procalcitonina incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos, métodos de inmunotransferencia, reacciones de aglutinación, una reacción de fijación del complemento, una reacción hemolítica, una reacción de precipitación, un método de coloide de oro, un método de cromatografía, fosforescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X, absorción de rayos X, magnetismo, emisiones resonantes fluorescentes o un método de inmunotinción. Algunos ejemplos de inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación, radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA o ELISA), un dispositivo de inmunoensayo Vidas® (Biomérieux, Hazelwood, Missouri), un sistema portátil de mano i-Stat® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois), un sistema de diagnóstico portátil de Philips (Philips Handheld Diagnostics, Países Bajos), inmunoensayos fluorescentes (FIA), inmunoensayos quimioluminiscentes, ensayos fisicoquímicos (TIA, LAPIA o PCIA), inmunoensayos de flujo lateral, o citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales para MxA se usaron en citometría de flujo modificada (Itazawa y otros, *Increased lymphoid MxA expression in acute asthma exacerbation in children*, *Allergy* Sep 2001 56(9): 895-8). Algunos inmunoensayos preferidos para estos biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, ELISA, inmunoensayos de fluorescencia, ensayos magnéticos, ensayos paramagnéticos, y ensayos quimioluminiscentes. En otras modalidades, pueden usarse ARNm o transcripciones de genes. En algunas modalidades preferidas, los ensayos se automatizan.

Un ejemplo particular de un dispositivo para determinar la presencia de proteína C reactiva, MxA y/o procalcitonina es un sistema de inmunoensayo multiparamétrico que es capaz de detectar dos o más de estos objetivos en el mismo dispositivo. Uno de esos dispositivos es un dispositivo de inmunoensayo Vidas® (Biomérieux, Hazelwood, Missouri), que podría probar la presencia de uno, dos, tres o los cuatro objetivos simultáneamente. El dispositivo de inmunoensayo Vidas® es un ensayo de fluorescencia ligado a enzimas (ELFA) (también disponible en una versión compacta llamada Mini Vidas®) y se usa ampliamente en laboratorios clínicos. Otros dispositivos que podrían usarse incluyen un sistema de inmunodiagnóstico Vitek® (Biomérieux, Hazelwood, Missouri) o un sistema de inmunoensayo Luminex® (Luminex Corporation, Austin, Texas). Otro ejemplo es un dispositivo similar a un sistema portátil de mano i-Stat® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, ver los dispositivos descritos en Patentes de EE. UU. núm. 5,638,828, 5,666,967, 5,653,243, 5,779,650, 6,010,463, 6,845,327, 6,896,778, 7,419,821, y 8,017,382). Otro ejemplo más es un dispositivo que combina la separación de partículas magnéticas con la detección quimioluminiscente, tal como el sistema de inmunoensayo multiparamétrico BioFlash (Biotek, Barcelona, España). Otro ejemplo es un dispositivo de diagnóstico portátil de Philips (Philips Handheld Diagnostics, Países Bajos).

Las infecciones virales y bacterianas son muy contagiosas y difíciles de diferenciar clínicamente debido a un solapamiento significativo de signos y síntomas, lo que a menudo conduce a una prescripción excesiva de antibióticos sistémicos y fomenta la resistencia a los antibióticos. En los países desarrollados, las infecciones respiratorias agudas son la principal causa de morbilidad y representan: El 20 % de las consultas médicas, el 30 % de las ausencias laborales y el 75 % de todas las prescripciones de antibióticos. En los EE. UU., hay aproximadamente 76 millones de visitas al consultorio médico anualmente por infección respiratoria aguda. La capacidad de detectar una respuesta inmune a una infección ayuda en la capacidad de diagnóstico clínico para diferenciar infecciones clínicamente



significativas y aquellas que resultan de una etiología viral y/o bacteriana y para diferenciar entre colonización e infección activa.

En modalidades preferidas, el marcador de infección viral es MxA y los marcadores de infección bacteriana son procalcitonina (PCT) y dos niveles de proteína C reactiva. Los niveles elevados de proteína MxA se correlacionan fuertemente con la infección viral sistémica y el aumento de la proteína C reactiva y la procalcitonina se asocian más con infecciones bacterianas. La presente invención incluye pruebas de detección de infecciones para identificar MxA, proteína C reactiva y procalcitonina en muestras. MxA está presente en los leucocitos (glóbulos blancos). Por lo tanto, la muestra puede tomarse en cualquier lugar donde haya leucocitos disponibles, por ejemplo, en una muestra de sangre periférica, aspirados nasofaríngeos, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, y aspirados del oído medio. En una modalidad preferida, la muestra se toma de sangre completa.

En algunas modalidades, se usa tampón de lisis para tratar la sangre completa en un tubo de vacío. En algunas modalidades, la sangre completa se lisa, preferentemente, antes de analizar la muestra para detectar los biomarcadores del hospedero. En algunas modalidades, una membrana y un tampón se usan para lisar directamente las células sanguíneas completas, separar la sangre en suero plasmático y filtrar desechos celulares para detectar una combinación de biomarcadores intracelulares y extracelulares. En algunas modalidades preferidas, no hay etapas externas o de preprocesamiento.

La concentración  $C_{50}$  para una prueba en particular, donde el 50 % de las veces una prueba leída visualmente se interpreta como positiva, depende de la agudeza visual de un individuo. La concentración  $C_{50}$  también se conoce como concentración de corte o concentración umbral por encima de la cual la prueba se considera positiva. Algunas veces también se le llama Punto de decisión médica por encima del cual el médico toma una decisión relevante. El Solicitante encontró que los valores de  $C_{50}$  deben ser  $\geq 25$  ng/ml a 35 ng/ml para MxA,  $\geq 15$  mg/l a 20 mg/l para CRP baja (equivalente en suero) y  $\geq 80$  mg/l a 100 mg/l para CRP alta (equivalente en suero). Más abajo de  $C_{50}$ , por ejemplo en  $C_5$  hay un 5 % de posibilidades de que el resultado se califique como positivo. Las concentraciones  $C_5$  comienzan en 10 ng/ml para MxA, aproximadamente 10 mg/l para CRP baja, y aproximadamente 30 mg/l para CRP alta. Estos no son falsos positivos porque hay algún analito presente en la muestra.

En algunas modalidades preferidas de prueba para la presencia de procalcitonina (que incluyen, pero no se limitan a, aquellas modalidades que prueban también para MxA y/o uno o ambos niveles de proteína C reactiva), la concentración umbral de procalcitonina en una muestra necesaria para obtener un resultado positivo es superior a aproximadamente 0,1 ng/ml. En otra modalidad preferida, la concentración umbral de procalcitonina en una muestra para provocar un resultado positivo es igual o mayor que aproximadamente 0,15 ng/ml. En otra modalidad preferida, la concentración umbral de procalcitonina en una muestra para provocar un resultado positivo es igual o superior a aproximadamente 0,25 ng/ml. En una modalidad preferida, el valor límite de procalcitonina se define como la media en la población normal + 2-3,5 veces la desviación estándar.

En otras modalidades preferidas de prueba para la presencia de MxA (que incluyen, pero no se limitan a, aquellas modalidades que prueban también la procalcitonina y/o uno o ambos niveles de proteína C reactiva), la concentración umbral de MxA en una muestra para provocar un resultado positivo puede ser tan bajo como aproximadamente 15 ng/ml; sin embargo, la concentración umbral puede ser mayor, en un intervalo de aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 400 ng/ml. En una modalidad preferida, la concentración umbral para obtener un resultado positivo para MxA es igual o superior a aproximadamente 25 ng/ml. En otra modalidad preferida, la concentración umbral para obtener un resultado positivo para MxA es igual o superior a aproximadamente 30 ng/ml. En otras modalidades preferidas, una concentración umbral para obtener un resultado positivo para MxA es igual o mayor que aproximadamente 40 ng/ml.

El valor de corte (concentración umbral) para analizar MxA depende de si se realiza un ensayo cuantitativo o cualitativo. Por ejemplo, el valor de corte para analizar MxA en ensayos de flujo lateral es, preferentemente, 40 ng/ml porque es un ensayo cualitativo. En algunas modalidades preferidas, es preferible un valor de corte de 25 ng/ml o un valor de corte de 35 ng/ml cuando se realizan ensayos cuantitativos. Cualquier valor de MxA entre aproximadamente 25 ng/ml y 40 ng/ml podría usarse, preferentemente, en un ensayo cuantitativo. Los valores de corte son, preferentemente, independientes de la tecnología y los estándares usados pueden alterar ligeramente los valores de corte. Lo importante es determinar si el biomarcador MxA está elevado. En una modalidad preferida, el valor de corte de MxA se define como la media en la población normal + 2-3,5 veces la desviación estándar.

En algunas modalidades preferidas de prueba para la presencia de un nivel bajo de proteína C reactiva (que incluyen, pero no se limitan a, aquellas modalidades que prueban también MxA, procalcitonina, y/o un nivel alto de proteína C reactiva), una concentración umbral para obtener un resultado positivo para el nivel bajo de proteína C reactiva es igual o mayor que un equivalente sérico de aproximadamente 6-20 mg/l de proteína C reactiva. En otras modalidades preferidas, la concentración umbral para obtener un resultado positivo para el nivel bajo de proteína C reactiva es igual o superior a un equivalente en suero de aproximadamente 10 mg/l de proteína C reactiva. Aún en otras modalidades preferidas, la concentración umbral para obtener un resultado positivo para el nivel bajo de proteína C reactiva es igual o superior a un equivalente en suero de aproximadamente 20 mg/l. En una modalidad preferida, el valor límite de la proteína C reactiva se define como la media en la población normal + 2-3,5 veces la desviación estándar.

En algunas modalidades preferidas de prueba para la presencia de un alto nivel de proteína C reactiva (que incluyen, pero no se limitan a, aquellas modalidades que prueban también MxA, procalcitonina y/o un bajo nivel de proteína C reactiva), la concentración umbral para obtener un resultado positivo para el nivel alto de proteína C reactiva es igual o superior a un equivalente sérico de aproximadamente 60-100 mg/l. En otra modalidad preferida, la concentración umbral para obtener un resultado positivo para el alto nivel de proteína C reactiva es igual o superior a un equivalente sérico de aproximadamente 80 mg/l. En otras modalidades preferidas, la concentración umbral para obtener un resultado positivo para el alto nivel de proteína C reactiva es igual o superior a un equivalente en suero de aproximadamente 65 mg/l.

Las concentraciones umbral de cada uno de los objetivos pueden depender del tamaño de la muestra que se aplica al dispositivo de ensayo (por ejemplo, una tira reactiva), así como también de su dilución, si corresponde.

En algunas modalidades, los dispositivos y métodos descritos en la presente descripción permiten la detección in vitro rápida, visual y cualitativa de MxA, proteína C reactiva y procalcitonina directamente a partir de sangre completa periférica. En una modalidad preferida, la prueba mide una respuesta inmune a una sospecha de infección viral y/o bacteriana en pacientes mayores de un año que presentan fiebre dentro de los siete días posteriores al inicio, con síntomas respiratorios consistentes con una enfermedad respiratoria y con un diagnóstico sospechoso de faringitis aguda o neumonía adquirida en la comunidad. Los resultados negativos no necesariamente excluyen la infección respiratoria y no deben usarse como base única para el diagnóstico, tratamiento u otras decisiones de manejo. En algunos casos, preferentemente, se usan pruebas de laboratorio adicionales (por ejemplo, cultivo bacteriano y viral, inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa viral y radiografía) y presentación clínica adicionalmente para confirmar si existe un patógeno específico de las vías respiratorias inferiores o faríngea.

En adición, existen algunas condiciones que conducen a falsos positivos o negativos erróneos. Estos incluyen, pero no se limitan a, el uso actual de medicamentos inmunosupresores por parte del paciente que proporciona la muestra, el uso actual de medicamentos antiinfecciosos orales por parte del paciente que proporciona la muestra, el uso actual de terapia con interferón (por ejemplo, para la esclerosis múltiple, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la hepatitis B (HBV) o virus de la hepatitis C (HCV)) por parte del paciente que proporciona la muestra, e inmunización con virus vivos dentro de los últimos 30 días por parte del paciente que proporciona la muestra. Son posibles tanto falsos negativos como falsos positivos ya que los niveles pueden fluctuar debido a la terapia. Los dispositivos que no forman parte de la invención y los métodos se destinan a uso profesional en un consultorio ambulatorio o clínica de atención de urgencia y deben usarse junto con otra información clínica (de laboratorio o radiográfica) y epidemiológica.

En algunas modalidades preferidas, un método para diferenciar entre colonización e infección activa incluye la etapa de realizar una primera prueba para detectar la presencia de bacterias o virus en una muestra. La primera prueba puede incluir, pero no se limita a, PCR, una prueba radiológica, IFA, una prueba rápida de antígenos o un cultivo bacteriano. Si la muestra es positiva para bacterias, se realiza una segunda prueba para detectar la presencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina y/o una presencia de al menos aproximadamente 15-20 mg/l de proteína C reactiva. Una presencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina o al menos aproximadamente 15-20 mg/l de proteína C reactiva indica una infección bacteriana activa. Una ausencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina o al menos aproximadamente 15-20 mg/l de proteína C reactiva en combinación con otros factores indica colonización bacteriana. Si la muestra es positiva para el virus, se realiza una tercera prueba para detectar una presencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA. Una presencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica una infección viral activa. La ausencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica una respuesta negativa o no sistémica del hospedero. En otras modalidades, se realizan pruebas solo para bacterias o solo para virus.

En una modalidad, las infecciones que se distinguen son infecciones respiratorias. En otras modalidades, se diferencian otros tipos de infecciones, que pueden ser bacterianas o virales, mediante el uso del sistema de la presente invención. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, infecciones gástricas, encefalitis, meningitis, gastroenteritis, enfermedades respiratorias febriles (incluidas bronquitis, faringitis, neumonía), celulitis, sinusitis, otitis media, infecciones de las vías urinarias y conjuntivitis.

La publicación de patente de EE. UU. 2010/0297611, publicada el 25 de noviembre de 2010, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections", publicación de patente de EE. UU. 2013/0196310, publicada el 1 de agosto de 2013, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections", patente de EE. UU. núm. 8,962,260, expedida el 24 de febrero de 2015, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections", y publicación de patente de EE. UU. 2013/0130367, publicada el 23 de mayo de 2013, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections", describen métodos y dispositivos para distinguir entre infecciones bacterianas y virales mediante la detección de marcadores bacterianos y virales en inmunoensayos de flujo lateral. En algunas modalidades preferidas de estas aplicaciones, el marcador viral es MxA y el marcador bacteriano es la proteína C reactiva.

"Sensibilidad" es la capacidad de detectar un resultado positivo. Por ejemplo, es menos probable que una prueba más sensible pase por alto un resultado positivo con una concentración muy baja. En una prueba cualitativa donde los

resultados se califican como positivos o negativos, la capacidad de determinar correctamente las muestras positivas que tienen bajas concentraciones del analito al tener un límite de detección más bajo es de suma importancia. Esto es especialmente cierto durante el curso temprano de cualquier infección o enfermedad donde el analito diana generalmente se encuentra en concentraciones bajas. Cuanto mayor sea la sensibilidad, menores serán los falsos negativos en el sistema.

"Especificidad" es la capacidad de identificar el analito específico sin interferencia de otros componentes. La especificidad también es la posibilidad de que una prueba sea negativa cuando el analito está ausente en la muestra. Cuanto mayor sea la especificidad, menores serán los falsos positivos en el sistema.

De forma aislada, ni la MxA ni la procalcitonina por sí solas son sensibles o específicas para identificar infecciones tanto virales como bacterianas. La procalcitonina es específica para identificar infecciones bacterianas, pero no es sensible a infecciones virales. MxA es específica para identificar infecciones virales, pero no es sensible para infecciones bacterianas. El uso conjunto de procalcitonina y MxA proporciona una forma sensible y específica de identificar una respuesta inmune a una infección viral y/o bacteriana.

En una modalidad preferida de un ensayo multiplexado que usa MxA y procalcitonina, el patrón de sangre por punción digital de los resultados de la prueba muestra un resultado positivo con una equivalencia sérica a un valor de corte de procalcitonina entre aproximadamente 0,10 ng/ml y 0,15 ng/ml y un valor de corte de MxA en un intervalo entre aproximadamente 25 ng/ml y 40 ng/ml. Estos valores preferidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Biomarcadores	Ubicación	Valor de corte de punción digital
MxA	Intracelular (células mononucleares de sangre periférica)	25-40 ng/ml
Procalcitonina	Extracelular (suero)	0,10-0,15 ng/ml

De manera similar, de forma aislada, ni la MxA ni la proteína C reactiva por sí solas son sensibles o específicas para identificar infecciones tanto virales como bacterianas. Los valores de corte bajos de la proteína C reactiva muestran una alta sensibilidad y una baja especificidad para detectar infecciones bacterianas. Los valores de corte altos de proteína C reactiva muestran una baja sensibilidad y una alta especificidad para detectar infecciones bacterianas. MxA es específica para identificar infecciones virales, pero no es sensible para infecciones bacterianas. Un patrón multiplexado de resultados que incluye puntos de decisión médica que reflejan niveles de corte de CRP baja, CRP alta y MxA juntos proporcionan una forma sensible y específica de identificar una respuesta inmune a una infección viral y/o bacteriana.

En una modalidad preferida de un ensayo multiplexado que usa MxA y dos niveles de proteína C reactiva, el patrón de sangre por punción digital de los resultados de la prueba muestra un resultado positivo con una equivalencia sérica a un valor de corte de nivel bajo de CRP entre aproximadamente 10 mg/l y 20 mg/l, una equivalencia sérica a un valor de corte de nivel alto de CRP entre aproximadamente 65 mg/l y 100 mg/l, y un valor de corte de MxA entre aproximadamente 25 ng/ml y 40 ng/ml. Estos valores preferidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Biomarcadores	Ubicación	Valor de corte de punción digital
MxA	Intracelular (células mononucleares de sangre periférica)	25-40 ng/ml
CRP baja	Extracelular (suero)	10-20 mg/l
CRP alta	Extracelular (suero)	65-100 mg/l

En una modalidad preferida de un ensayo cualitativo de lectura visual multiplexada que usa MxA y dos niveles de proteína C reactiva, el patrón sanguíneo de los resultados de la prueba muestra un resultado positivo con una equivalencia sérica a un valor de corte de nivel bajo de CRP entre aproximadamente 10 mg/l y 20 mg/l, una equivalencia sérica a un valor de corte de nivel alto de CRP entre aproximadamente 60 mg/l y 100 mg/l, y un valor de corte de MxA entre aproximadamente 15 ng/ml y 25 ng/ml.

En otra modalidad preferida de un ensayo multiplexado que usa MxA, procalcitonina y dos niveles de proteína C reactiva, el patrón de sangre de punción digital de los resultados de la prueba muestra un resultado positivo con una equivalencia sérica a un valor de corte de nivel bajo de CRP entre aproximadamente 10 y 20 mg/l, una equivalencia sérica a un valor de corte de nivel alto de CRP entre aproximadamente 80 mg/l y 100 mg/l, una equivalencia sérica de procalcitonina entre aproximadamente 0,10 ng/ml y 0,15 ng/ml y un valor de corte de MxA entre aproximadamente 25 ng/ml y 40 ng/ml. Estos valores preferidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Biomarcadores	Ubicación	Valor de corte de punción digital
MxA	Intracelular (células mononucleares de sangre periférica)	25-40 ng/ml
CRP baja	Extracelular (suero)	10-20 mg/l
CRP alta	Extracelular (suero)	65-100 mg/l
Procalcitonina	Extracelular (suero)	0,10-0,15 ng/ml

Los niveles elevados de proteína C reactiva o procalcitonina por sí solos son indicadores inespecíficos. Por ejemplo, en la infección por influenza, hay un nivel elevado de proteína C reactiva que puede llevar al médico a recetar antibióticos por error. Cuando la proteína C reactiva o la procalcitonina se multiplexan con MxA, se identifica la verdadera etiología (viral o no viral), lo que puede conducir a una intervención terapéutica adecuada y oportuna.

La especificidad de estas pruebas se mejora aún más al restringir el uso previsto. Por ejemplo, solo se prueban ciertas edades de la población de pacientes (preferentemente, de un año de edad o más) y/o los pacientes con afecciones subyacentes específicas que pueden conducir a factores de confusión, preferentemente, no se examinan con estas pruebas.

#### Colonización/estado de portador versus infección activa

La relevancia clínica microbiana se basa en la respuesta del hospedero. El tratamiento excesivo de bacterias colonizadoras y el tratamiento insuficiente de una posible infección bacteriana significativa se frustran con los métodos descritos en la presente descripción.

La prescripción tardía de antibióticos se recomienda en las guías internacionales (Grupo de desarrollo de directrices NICE. Prescribing of antibiotics for self-limiting respiratory tract infections in adults and children in primary care. 2014, incorporado en la presente descripción como referencia). El National Institute for Health and Care Excellence (NICE) recomienda actualmente usar una estrategia de no prescribir antibióticos o prescribirlos con retraso para tratar los dolores de garganta agudos no complicados y otras infecciones respiratorias.

El borrador de las directrices del NICE recomienda considerar una prueba de proteína C reactiva (CRP) en el lugar de atención para pacientes que presentan infección de las vías respiratorias inferiores en atención primaria si no está claro después de la evaluación clínica si se deben prescribir antibióticos. Los resultados de la prueba de proteína C reactiva deben usarse para guiar la prescripción de antibióticos de la siguiente manera:

- No ofrecer de forma rutinaria terapia con antibióticos si la concentración de proteína C reactiva es inferior a 20 mg/l.
- Considere una prescripción tardía de antibióticos (una prescripción para usar en una fecha posterior si los síntomas empeoran) si la concentración de proteína C reactiva está entre 20 mg/l y 100 mg/l.
- Ofrecer terapia con antibióticos si la concentración de proteína C reactiva es superior a 100 mg/l.

#### Directrices- IDSA y NICE

De acuerdo con la Infectious Diseases Society of America (IDSA) (Caliendo AM y otros. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. Clin Infect Dis. 2013 diciembre; 57 suplemento 3:S139-70), las futuras pruebas diagnósticas deberían tener las siguientes características:

- Realizarse directamente a partir de muestras clínicas accesibles y mínimamente invasivas, tales como sangre, muestras respiratorias, orina y heces.
- Ser capaces de descartar la infección con alta certeza (valor predictivo negativo) como primera etapa para una variedad de síndromes clínicos.
- Ser capaces de apoyar la diferenciación de la infección viral de la bacteriana.
- Incorporar biomarcadores que sean derivados de patógenos o del hospedero y capaces de indicar la respuesta del hospedero a un patógeno o clasificar procesos infecciosos clínicamente significativos en categorías relevantes (por ejemplo, bacterianos o virales).

Una estrategia de diagnóstico que incorpore biomarcadores sensibles (por ejemplo, infección presente sí/no) seguidas de pruebas específicas de patógenos que se vinculen a una evaluación rápida de la resistencia a los medicamentos no solo podría llevar la administración de antibióticos al ámbito ambulatorio sino también revolucionar el tratamiento de la sepsis. Los estudios clínicos que evaluaron la presencia de virus respiratorios en pacientes asintomáticos indican que la antigua doctrina, que consideraba clínicamente significativa la presencia de cualquier virus respiratorio, ya no es cierta. Los ácidos nucleicos detectados pueden provenir de organismos no viables o de bacterias o virus comensales (no patógenos) o colonizadores que no contribuyen a la enfermedad. Las pruebas basadas en patógenos también deben tener en cuenta las tasas de colonización en niños, especialmente debido a sus altas tasas de colonización neumocócica. El desafío con las bacterias típicas y algunos patógenos virales es la necesidad de determinar si el patógeno identificado coloniza o invade. La procalcitonina, MxA y proteína C reactiva son

biomarcadores prometedores que pueden usarse, en adición a la fiebre, leucocitosis, y síndrome clínico, como predictores de infección bacteriana (PCT y CRP) o viral (MxA).

Actualmente, la definición médica de colonización es la presencia de una bacteria o un virus sin una respuesta inmune asociada de anticuerpos detectable en la sangre. La capacidad de usar la serología para detectar respuestas de anticuerpos requiere dos visitas al paciente, una visita inicial al inicio de los síntomas y una visita posterior 2-4 semanas después. Debido al retraso inherente, no es práctico realizar esta prueba para confirmar una infección activa. Por lo tanto, la mayoría de los médicos simplemente confían en pruebas de antígenos, cultivos, o PCR para identificar la presencia de una bacteria o un virus en lugar de usar serología emparejada, que combina la identificación con una respuesta de anticuerpos. Esto da como resultado una sobreestimación significativa de la infección verdadera y la posterior prescripción excesiva de antibióticos innecesarios.

Tradicionalmente, la confirmación de una infección se mide mediante la presencia o ausencia de antígeno microbiano, crecimiento del cultivo o ácido nucleico. Sin embargo, ninguna de estas pruebas distingue entre colonización e infección activa. En realidad, se requiere más que la presencia o ausencia de un antígeno microbiano para indicar una infección. Una infección verdadera y activa también requiere una respuesta inmune asociada. Sin la respuesta inmune, se produce la colonización de bacterias o virus. Solo una infección verdadera requiere terapia con antibióticos. Las bacterias colonizadas típicamente no son contagiosas y no requieren intervención terapéutica.

Existe un desafío para definir una verdadera infección por colonización bacteriana o una infección viral local sin una respuesta sistémica del hospedero. Es necesario que haya un cambio en la definición de infección, lo que cambiará los parámetros de diagnóstico y el rendimiento informado de una prueba. La nueva definición que debe adoptarse y estandarizarse para una infección respiratoria clínicamente significativa requiere la confirmación de la presencia de un patógeno mediante antígeno, cultivo o detección molecular en asociación con una respuesta sistémica del hospedero.

Como se define recientemente en la presente descripción, una infección clínicamente significativa es la confirmación microbiológica local de un patógeno mediante cultivo celular, técnicas moleculares y antígeno en asociación con una respuesta inmune sistémica (proteína C reactiva, procalcitonina, MxA o respuesta serológica).

Los pacientes con síntomas respiratorios febriles agudos pueden clasificarse primero según tengan o no una respuesta inmune clínicamente significativa. La definición de infección auténtica es aquella en la que un virus o bacteria se identifica mediante detección de antígenos, cultivo celular o PCR y se asocia con una respuesta inmunitaria. La falta de una respuesta inmune asociada confirma la colonización. De los pacientes con una respuesta inmune clínicamente significativa, pueden clasificarse como virales o bacterianos. De las respuestas inmunitarias clínicamente insignificantes (colonizadores), éstas típicamente son alérgicas e impulsadas a través de una vía de IgE como resultado de la exposición a un alérgeno (que puede ser un virus no invasivo como el rinovirus o el coronavirus), lo que lleva a una exacerbación subsecuente de la enfermedad de las vías respiratorias reactiva en pacientes con antecedentes de alergias subyacentes, atopia, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Un enfoque más apropiado para estimar la posibilidad de infección bacteriana o viral y la gravedad de la enfermedad es usar biomarcadores sanguíneos que reflejen la respuesta del hospedero a la infección e, indirectamente, la gravedad de la infección. MxA puede usarse para diferenciar una infección viral invasiva de una asintomática/colonización. En adición, pueden usarse procalcitonina y/o proteína C reactiva para diferenciar la colonización bacteriana de la infección.

Distinguir una infección asintomática (estado de portador) sin respuesta del hospedero de una infección clínicamente significativa es de vital importancia para definir un estándar de oro comparativo objetivo. Los cultivos bacterianos orofaríngeos de rutina con frecuencia desarrollan bacterias que no son patógenas ni responsables de una infección activa. El crecimiento bacteriano en presencia de una respuesta inmune del hospedero es mucho más indicativo de una infección bacteriana clínicamente significativa. Las pruebas moleculares son tan sensibles, usadas independientemente, que a menudo proporcionan información clínicamente engañosa, ya que las pruebas moleculares no pueden diferenciar una infección activa de un estado de portador. Para algunos patógenos virales, la combinación de una prueba molecular positiva junto con una respuesta del hospedero es la característica diferenciadora de una infección clínicamente importante.

Los métodos descritos en la presente descripción son capaces de distinguir entre infección/respuesta inmune (por ejemplo, mediante el uso de niveles de MxA, procalcitonina y/o proteína C reactiva) y colonización (concentración de organismos en un sitio, aunque el organismo no cause signos o síntomas nocivos). La colonización puede persistir durante días o años, y la resolución se influye por la respuesta inmune del organismo, la competencia en el sitio por parte de otros organismos y, a veces, el uso de antimicrobianos. Un portador es una persona colonizada que puede transmitir el organismo a otras personas. Por otra parte, la contaminación se produce cuando se introduce un microbio en la muestra desde otro sitio.

Estudios muy recientes demostraron que la alta sensibilidad de la PCR dificulta la interpretación de resultados positivos en infecciones agudas. Los ensayos de PCR permiten la detección incluso de cantidades trazas de ácidos nucleicos virales. Esto puede conducir a resultados positivos incluso en ausencia de síntomas o sin que el patógeno sea el

agente etiológico. Es muy probable que esto se explique, al menos en parte, por la extrema sensibilidad de la PCR, que la hace propensa a detectar infecciones subclínicas, transporte, persistencia y contaminación.

La especificidad clínica de las pruebas de PCR para infecciones agudas de las vías respiratorias se cuestionó recientemente en diversos estudios separados (van Gageldonk-Lafeber AB, Heijnen ML, Bartelds AI, y otros, A case-control study of acute respiratory tract infection in general practice patients in The Netherlands. Clin Infect Dis. 2005 agosto 15;41(4):490-7; Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, y otros, Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values, J Clin Microbiol. 2011 julio;49(7):2631-6; Rhedin S, Lindstrand A, Rotzén-Östlund M, y otros, Clinical utility of PCR for common viruses in acute respiratory illness, Pediatrics. 2014 marzo; 133(3):e538-45; Advani, y otros, Detecting respiratory viruses in asymptomatic children, Pediatr Infect Dis J. 2012 diciembre;31 (12):1221-6; van der Zalm MM, van Ewijk BE, Wilbrink B, y otros, Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. J Pediatr. 2009 marzo;154(3):396-400, 400; Linde A. The importance of specific virus diagnosis and monitoring for antiviral treatment. Antiviral Res. 2001 agosto;51:81-94. Revisión).

Un ejemplo de colonización generalizada de bacterias gramnegativas es el hecho de que más de la mitad de las personas sanas portan *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* en la boca (O'Brien KL y otros, Pediatr Infect Dis J. 2003;22:133-40). *Staphylococcus aureus* puede aislarse de la cavidad bucal en el 20-40 % de las personas sanas (Barlow y Chattaway. (1969). Observations on the carriage of *Candida albicans* in man. British Journal of Dermatology 81, 103-106; Wheat y otros (1981). Effect of Rifampin on nasal carriers of coagulase-positive staphylococci. Journal of Infectious Diseases 144,177; Le y otros, Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2007;133(10):969-72). Mediante el uso de un caldo de enriquecimiento sensible, se cultivó *S. aureus* de los dos sitios de 259 pacientes al ingresar a una sala de ortopedia y de 87 miembros del personal de la misma sala. La garganta fue el lugar de portador más común en ambos grupos. El cuarenta por ciento de los pacientes y el 54 % del personal dieron positivo para *S. aureus* en la garganta (Nilsson y Ripa, *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. J Clin Microbiol. 2006;44:3334-9).

Boe y otros informaron una tasa de aislamiento del 31 % en pacientes admitidos en una sala médica (Boe y otros, 1964. Perineal carriers of staphylococci. Br. Med. J. 5404:280-281) y Uemura y otros informaron una tasa de aislamiento del 29 % en un grupo de voluntarios adultos sanos (Uemura y otros, 2004. Comparative characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from throats and noses of healthy volunteers. Jpn. J. Infect. Dis. 57-21-24). Berkovitch y otros encontraron bacterias en la garganta del 10 % de los niños sanos menores de 2 años (Berkovitch y otros, 2002. Colonization rate of bacteria in the throat of healthy infants. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 63:19-24). Estas especies se denominan cepas adquiridas "comunitarias" debido a su alta prevalencia en hospederos normales. La portación oral de especies de Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Acinetobacter es menos común en personas sanas (Rosenthal y Tager, (1975). Prevalence of Gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. Annals of Internal Medicine 83,355-357).

La colonización oportunista con organismos gramnegativos resistentes (*Enterobacter cloacae*, especies de *Klebsiella*, presentes en el esputo) se encontró en el 56 % de los pacientes ingresados en el hospital con exacerbaciones graves de bronquitis crónica y persistió durante el seguimiento (48 %) con un exceso significativo. de nuevos organismos (Trigg CJ y otros, Respir Med. 1991;85:301-8).

Ejemplos de colonización generalizada de bacterias grampositivas incluyen el hecho de que hasta el 25 % - 40 % de los pacientes están colonizados con estreptococos del grupo A (GAS) en la orofaringe (Schwartz RH y otros, Penicillin V for group A streptococcal pharyngotonsillitis. A randomized trial of seven vs ten days' therapy. JAMA 1981; 246:1790; Strömberg A y otros, Scand J Infect Dis. 1988;20(4):411-7; Shulman ST y otros, Pediatr Infect Dis J. 1994;13:1-7; Le TM y otros, Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2007;133(10):969-72; Del Mar C. Managing sore throat: a literature review. I. Making the diagnosis. Med J Aust 1992; 156: 579-575). Solo el 60 % de los pacientes con estreptococo del grupo A con cultivo positivo tuvieron una respuesta de anticuerpos asociada con antiestreptolisina O (ASO) o anti DNasa B (ADB) (Johnson DR y otros, The human immune response to streptococcal extracellular antigens: clinical, diagnostic, and potential pathogenetic implications. Clin Infect Dis. 2010 febrero 15;50(4):481-90). En la garganta de casi el 10 % de los niños sanos surgió un crecimiento abundante de *Streptococcus pyogenes* (Bell SM y Smith DD. Lanceta. 1976;2(7976):62-3).

La cavidad orofaríngea posee mecanismos de defensa contra la colonización por especies aeróbicas de Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Acinetobacter. Diversos factores contribuyen a la integridad de la defensa de la colonización, que incluyen la anatomía y fisiología apropiadas (por ejemplo, pH de la saliva), motilidad, inmunoglobulina A secretora, recambio de células de la mucosa y flora oral autóctona (Spijkervet y otros, Colonization index of the oral cavity: a novel technique for monitoring colonization defense. Microbial Ecology in Health and Disease; 1989;2:145-151). Todos estos factores interactúan dentro del hospedero para contribuir a una eliminación efectiva de las especies de Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Acinetobacter. Si uno de los factores de defensa se altera, tal como, por ejemplo, con el envejecimiento, una enfermedad subyacente, una intervención médica o antecedentes de agentes antibacterianos, estas bacterias gramnegativas tienden a colonizar.

Para que se produzca la colonización, se necesita un contacto prolongado de la mucosa con las bacterias y, como era de esperar, las enfermedades asociadas con la alteración del aclaramiento mucociliar son exactamente las afecciones que se complican con la colonización crónica de las vías respiratorias. Así, el paciente con bronquitis crónica suele estar colonizado por *H. influenzae* y *M. catarrhalis*, mientras que el paciente con fibrosis quística o bronquiectasias suele estar colonizado por *P. aeruginosa* (Niederman, Gram-negative colonization of the respiratory tract: pathogenesis and clinical consequences. *Semin Respir Infect* 1990; 5: 173-184).

Los portadores de *Chlamydia pneumoniae*, que representan 2-5 % de la población, pueden ser la fuente de la infección, pero no presentan los síntomas de una infección aguda. La infección puede adoptar una forma sintomática en condiciones inmunocomprometidas. El estado de portador no requiere tratamiento (Choroszy-Krol y otros, Infections caused by *Chlamydia pneumoniae*. *Adv Clin Exp Med*. 2014 enero-febrero;23(1):123-6).

Existe un amplio espectro de síntomas de las vías respiratorias en caso de detección de *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae*, que van desde una infección asintomática (o portador) hasta una neumonía grave. Tanto *C. pneumoniae* como *M. pneumoniae* pueden colonizar o persistir en las vías respiratorias durante semanas e incluso meses después de la infección aguda y la resolución de los síntomas asociados con la infección inicial.

En una población pediátrica no seleccionada de preescolares y escolares, la tasa de infección asintomática superó el 50 %. Si hubo síntomas de las vías respiratorias, generalmente no fueron graves (Schmidt y otros, *Chlamydia pneumoniae carriage and infection in hospitalized children with respiratory tract diseases*. *Infection*. 2003 diciembre; 31(6):410-6). Al examinar a 65 pacientes sintomáticos con faringitis, Esposito y otros demostraron que la proteína C reactiva estaba elevada a una media de 34-38 mg/l para los casos de clamidia, micoplasma y estreptococos del grupo A. Además, el 5 % de los controles sanos tenían *Chlamydia* o *Mycoplasma* y el 21 % tenían estreptococos del grupo A. Además, el 28 % (7/25) de los pacientes que dieron positivo en la prueba de ADN de *Chlamydia* no tenían evidencia serológica de infección verdadera (Esposito y otros, Aetiology of acute pharyngitis: the role of atypical bacteria. *J Med Microbiol*. 2004;53:645-51). Se detectó *C. pneumoniae* en frotis de garganta mediante PCR-EIA en el 9,3 % (74 de 798 niños). Mediante el uso de PCR, la prevalencia de clamidia se encuentra entre 1 - 2 % de los adultos asintomáticos y entre 4-6 % de los niños asintomáticos (4-6 %). Hubo un bajo poder de confirmación entre la detección de *C. pneumoniae* en las vías respiratorias superiores y la respuesta inmune sistémica que resultó en una infección aguda según la serología. La detección de *C. pneumoniae* en las vías respiratorias superiores sin respuesta sistémica de anticuerpos, que ocurrió en el 17 % (9/52), sugiere portador.

Se inscribieron en un estudio transversal niños asintomáticos (n=405) y niños con síntomas respiratorios (n = 321) de edades comprendidas entre 3 meses y 16 años, del 1 de julio de 2008 al 30 de noviembre de 2011. Se recogieron datos clínicos, muestras faríngeas y nasofaríngeas y muestras de suero. El objetivo principal fue diferenciar entre colonización e infección sintomática por *M. pneumoniae* mediante los métodos de diagnóstico actuales, especialmente la PCR en tiempo real. Se detectó ADN de *M. pneumoniae* en el 21,2 % (CI del 95 %: 17,2 % - 25,2 %) de los niños asintomáticos y en el 16,2 % (CI del 95 %: 12,2 % - 20,2 %) de los niños sintomáticos (p = 0,11). Ni la serología, ni la PCR cuantitativa ni el cultivo diferenciaron el transporte asintomático de la infección. Un total de 202 niños se examinaron para detectar la presencia de otros patógenos bacterianos y virales. Se encontraron dos o más patógenos en el 56 % (63/112) de los niños asintomáticos y en el 55,5 % (50/90) de los niños sintomáticos. Finalmente, el muestreo longitudinal mostró persistencia de *M. pneumoniae* en la URT por hasta 4 meses (Spuesens y otros, Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in the upper respiratory tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study. *PLoS Med* 2013; 10:e1001444).

Durante un estudio prospectivo de 30 meses en los Países Bajos, se estudió la distribución de *Mycoplasma pneumoniae* y virus respiratorios entre 1172 pacientes con infección respiratoria aguda (ARI) que se trataron en el ámbito ambulatorio de un médico general. *M. pneumoniae*, detectada mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa, estuvo presente en 39 (3,3 %) pacientes. Nueve de los 12 contactos domésticos positivos para *M. pneumoniae* tenían < 16 años (p = 0,02) y 4 (44 %) de ellos no desarrollaron ARI. Al parecer, los niños son un reservorio importante de *M. pneumoniae*. (Dorigo-Zetsma y otros, Results of molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* among patients with acute respiratory infection and in their household contacts reveals children as human reservoirs. *J Infect Dis*. 2001 febrero 15;183(4):675-8).

Incluso la tos ferina puede provocar una infección asintomática. De hecho, las inmunizaciones dieron lugar a que se alberguen bacterias en las que los adultos actúan como reservorio. En un estudio, cuatro niños con tos ferina y sus 18 miembros de la familia fueron sujetos de un estudio de 1 año para detectar infecciones y respuestas de anticuerpos a *Bordetella pertussis*. La tasa de ataque de infección por tos ferina en contactos fue del 83 %. Dos tercios de los casos en estos contactos inmunizados fueron subclínicos. Después de la vacuna contra la tos ferina, la inmunidad a la enfermedad es mayor que la protección contra la infección (Long y otros, Widespread silent transmission of pertussis in families: antibody correlates of infection and symptomatology. *J Infect Dis*. 1990 marzo;161(3):480-6. 1990).

En las vías respiratorias superiores, hasta el 26 % de los niños están colonizados por estreptococos del grupo A (GAS) (Reed y otros, Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma pneumoniae* in children with and without pharyngitis. *J Fam Pract*. 1988;26(4):387-392; Lieu y otros, Clinical evaluation of a latex agglutination test for streptococcal pharyngitis: performance and impact on treatment rates. *Pediatr Infect Dis J*. 1988;7(12):847-854;

Shulman y otros, Streptococcal pharyngitis: The case for penicillin therapy. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:1-7; Roberts y otros, Detection of group A Streptococcus in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC Pediatr* 2012; 12:3) y de acuerdo con las Infectious Disease Society of America Clinical Guidelines, la importancia clínica del número de colonias de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos del grupo A presentes en la placa de cultivo de garganta es problemática. Si un procedimiento de cultivo sensible da como resultado la detección de pocas o muchas colonias del organismo, el paciente puede estar infectado o simplemente colonizado (Gerber y otros, 1986. Antigen detection test for streptococcal pharyngitis: evaluation of sensitivity with respect to true infection. *J. Pediatr*. 108:654-658; Kaplan y otros, 1971. Diagnosis of streptococcal pharyngitis: differentiation of active infection from the carrier state in the symptomatic child, *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 123, núm. 5 (mayo, 1971), pág. 490-501; Kellogg y otros, 1986. Detection of group A streptococci in the laboratory of physician's office. Culture vs. antibody methods. *J. Am. Med. Assoc.* 255:2638-2642). Bell y otros, (Quantitative throat-swab culture in the diagnosis of streptococcal pharyngitis in children. *Lancet*. 1976 julio 10;2(7976):62-3) demostraron una diferencia en la detección de un crecimiento abundante de *Streptococcus pyogenes* en hisopos de garganta tomados de 1054 niños con faringitis en comparación con los de 462 niños normales cuando se usó una técnica estandarizada de cultivo cuantitativo. En pacientes con faringitis, el 71 % de los aislamientos eran pesados, mientras que se obtuvo un cultivo pesado en casi el 10 % de los niños sanos. Otros autores informan una tasa del 6 % - 40 % de portadores asintomáticos falsos positivos de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos en frotis de garganta en personas sanas (Del Mar, 1992. Managing sore throat: a literature review. I. Making the diagnosis. *Med J Aust* 1992; 156: 572-575).

Por razones clínicas así como también técnicas, no existe una correlación significativa entre el recuento de colonias y la presencia o ausencia de infección (Kellogg y otros, 1986. Detection of group A streptococci in the laboratory of physician's office. Culture vs. antibody methods. *J. Am. Med. Assoc.* 255:2638-2642). La diferenciación entre infección y colonización requiere la demostración de una respuesta de anticuerpos al organismo, una respuesta que requiere mucho tiempo (requiere de 2 a 3 semanas o más entre muestras de suero) y está sujeta a resultados falsos negativos después de una terapia antibiótica inmediata y adecuada (Gerber y otros, 1988. The group A streptococcal carrier state. A reexamination. *Am. J. Dis. Child.* 142:562-565). Aunque es probable que los pacientes con faringitis aguda verdadera por estreptococos del grupo A tengan cultivos más positivos que los pacientes portadores de estreptococos, existe tanta superposición en el grado de positividad de los resultados de los cultivos de garganta que no puede hacerse una diferenciación exacta basándose únicamente en esta base. (Bisno y otros, Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis, *Clinical Infectious Diseases* 2002; 35:113-25).

El estreptococo betahemolítico del grupo A (GAS) se considera la causa bacteriana predominante (10-26 % de todos los casos de amigdalitis aguda) de amigdalitis aguda y en la mayoría de los países es el único patógeno para el cual actualmente se recomienda la terapia con antibióticos (Christensen y otros, Are procalcitonin or other infection markers useful in the detection of group A streptococcal acute tonsillitis? *Scand J Infect Dis.* 2014 mayo;46(5):376-83. 2014). La especificidad clínica disminuye debido a la escasa capacidad de la prueba para diferenciar entre pacientes con amigdalitis aguda por GAS y portadores de GAS con una infección amigdalina de otro origen.

No solo las bacterias pueden colonizar, sino también los virus. Los virus respiratorios como la influenza A/B, el virus de la parainfluenza 1-4, el metapneumovirus y el virus sincitial respiratorio 1-2 se consideran verdaderos patógenos. El virus del herpes simple, el virus de Epstein Barr y el citomegalovirus pueden provocar una diseminación asintomática en la faringe y la boca, lo que no tiene importancia clínica. Se sabe que el rinovirus y el coronavirus colonizan la nasofaringe (van der Zalm y otros, Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr.* 2009 marzo;154(3):396-400, 400.e1). Los rinovirus y los coronavirus son los virus respiratorios identificados con más frecuencia que se encuentran en las pruebas nasofaríngeas tanto de casos sintomáticos como de casos asintomáticos (van der Zalm, 2009). Se detectaron rinovirus humanos en entre el 20 % y el 50 % de las muestras y coronavirus en el 10 % de los pacientes asintomáticos (van Bentem I y otros, *Pediatr Allergy Immunol.* 2003;14(5):363-70; van der Zalm MM y otros, *J Pediatr.* 2009;154(3):396-400, 400.e1; Rhedin S y otros, *Pediatrics.* 2014;133(3):e538-45; Nokso-Koivisto J y otros, Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol.* 2002;66(3):417-20). El coronavirus y el rinovirus típicamente no causan fiebre, pero están muy asociados con la congestión nasal (Zimmerman y otros, *Influenza Other Respir Viruses.* 2014;8(4):397-405).

Se sugirió que no solo se necesita presencia, sino más bien una cierta carga viral por encima de la cual se producen síntomas respiratorios (Jansen y otros, (2011). Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol* 49: 2631-2636). Se encontraron rinovirus y coronavirus humanos en niveles iguales de 22 % y 6 % respectivamente en pacientes sanos y sintomáticos, mientras que todos los demás virus no se encontraron en niños sanos en niveles significativos (van Bentem y otros, Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003 octubre;14(5):363-70; Rhedin y otros, Clinical utility of PCR for common viruses in acute respiratory illness. *Pediatrics.* 2014 marzo;133(3):e538-45). El hecho de que el rinovirus se encuentre a menudo en niños asintomáticos no es sorprendente, porque generalmente es un patógeno relativamente leve que puede colonizar la mucosa nasal sin causar síntomas (van Bentem y otros, 2003) y los estudios de van Bentem indican que los patógenos respiratorios se encuentran con frecuencia en muestras de niños sin síntomas respiratorios (40 %). Nokso-Koivisto demostró que la tasa de detección viral era del 45 % en niños con infecciones respiratorias recientes o pasadas relacionadas. Treinta y uno (29 %) de los aspirados nasofaríngeos fueron positivos para ARN viral, 18 % para rinovirus y 11 % para ARN de enterovirus. Además, el 81 % de los niños con muestras positivas para el virus tuvieron síntomas respiratorios



previamente o había síntomas respiratorios concurrentes en otros miembros de la familia (Nokso-Koivisto y otros, Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. J Med Virol. 2002 marzo;66(3):417-20).

De acuerdo con la literatura, el coronavirus y el rinovirus típicamente no causan fiebre, aunque colonizan la nasofaringe y la orofaringe en hasta un 10-40 % de las personas normales y sanas. Durante enero-abril de 2012, 662 pacientes ambulatorios con enfermedad respiratoria aguda ( $\leq 7$  días) se evaluaron con una MRT-PCR múltiple (SRT-PCR) para examinar la distribución de los virus y las características de los pacientes mediante el uso de regresión logística multinomial. De los rinovirus y coronavirus detectados como un solo virus, menos del 10 % de sus infecciones provocaban fiebre acompañante. Cuando se realizó un análisis de regresión multinomial con la razón de las probabilidades ajustadas, el riesgo de fiebre asociado con rinovirus y coronavirus estuvo entre 0,85-1,15; sin embargo, ambos estaban altamente asociados con la congestión nasal (Zimmerman y otros, Influenza and other respiratory virus infections in outpatients with medically attended acute respiratory infection during the 2011-12 influenza season. Influenza Other Respir Viruses. 2014 julio;8(4):397-405).

Hasta el 68 % de los niños sanos asintomáticos portan múltiples virus respiratorios en la nasofaringe en un momento dado (Jartti T y otros, Pediatr Infect Dis J 2008;27(12): 1103-1107).

Los factores virales que contribuyen a la enfermedad equivalen a la proporción de todos los casos hospitalizados relacionados con un virus específico/tasa de presencia en niños asintomáticos (Singleton y otros, J Med Virol 2010;82(7): 1282-90). El grupo 1 incluye virus con una contribución significativamente superior a los síntomas respiratorios, que incluyen virus RSV, Metapneumovirus, Parainfluenza, e Influenza. Los virus del grupo 2, que incluyen los rinovirus, adenovirus y coronavirus humanos, tienen menos probabilidades de causar una infección activa significativa.

La infección por rinovirus permanece localizada en las vías respiratorias superiores. Esto ocurre por una razón muy importante: los rinovirus son replicadores extremadamente ineficientes a temperaturas superiores a 33 °C. El virus puede llegar a la porción inferior de los pulmones, pero las temperaturas allí serán varios grados más cálidas (aproximadamente 37 °C) y no favorecerán la infección por rinovirus. El virus también será tragado y terminará en el estómago, donde tanto el aumento de la temperatura como la disminución del pH actúan para evitar la infección. A diferencia del poliovirus, la cápsida del rinovirus (cubierta proteica protectora) se desmonta irreversiblemente a un pH bajo, lo que inactiva efectivamente el virus. Se detectó ARNm de rinovirus en niños durante períodos prolongados, incluso después de que los síntomas desaparecieron (Blomqvist y otros, Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children. J Med Virol 2002;66:263-8.; Jartti y otros, Serial viral infections in infants with recurrent respiratory illnesses. Eur Respir J 2008;32:314-20. 15; Jartti y otros, Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. J Med Virol 2004;72:695-9; Peltola y otros, Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. J Infect Dis 2008;197:382-9), y es posiblemente más prolongado en pacientes con asma (Kling y otros, Persistence of rhinovirus RNA after asthma exacerbation in children. Clin Exp Allergy 2005;35:672-8).

Se informó que la proteína MxA no se induce por infecciones por rinovirus humanos (HRV) cuando se usa la PCR para detectar rinovirus en aspirados nasofaríngeos. Se pensó que esta discrepancia entre la detección por PCR y la falta de MxA sistémica se debía a la falta de una infección respiratoria genuina relacionada con el estado de portador a largo plazo o una infección latente por rinovirus (Mäkelä y otros, Eur J Clin Microb Inf Dis., 18: 655-668, 1999). Koskenvuo demostró que las infecciones virales confirmadas por laboratorio distintas de los rinovirus dieron como resultado niveles elevados de expresión de la proteína MxA en niños que recibían tratamiento contra el cáncer en comparación con sus infecciones bacterianas confirmadas o muestras de control (Koskenvuo y otros, Pediatr Hematol Oncol., 23(8): 649-660, diciembre 2006). La observación de que los rinovirus no son capaces de inducir una expresión sistémica significativa de la proteína MxA también está de acuerdo con otros hallazgos de Mäkelä y otros (Mäkelä 1999).

Mientras que otros virus respiratorios, tales como el virus de la influenza y el virus respiratorio sincitial (RSV), provocan una destrucción de las células epiteliales de las vías respiratorias, el rinovirus rara vez se asocia con citopatología de las vías respiratorias superiores. Mediante el uso de microscopía electrónica de barrido y óptica de muestras de biopsia nasal de sujetos con resfriados naturales, Winther y otros encontraron que las células epiteliales se habían desprendido; sin embargo, el revestimiento y los bordes de las células epiteliales permanecieron estructuralmente intactos (Winther y otros, Acta Otolaryngol. 97: 309-318, 1984). Se observó una preservación similar de la morfología y composición celular del epitelio nasal durante estudios de infección experimental por HRV, donde la cantidad de eliminación viral no se correlacionó con la gravedad de los síntomas (Winther y otros, Acta Otolaryngol. 97: 309-318, 1984; Turner y otros, J. Infect. Dis. 145: 849-853, 1982; Winther y otros, Acta Otolaryngol.(Stockh), 413(Suplemento):19-24, 1984).

La presencia de la combinación de biomarcadores virales y bacterianos descritos en la presente descripción en una muestra de paciente indica la presencia de una infección clínicamente significativa. Cuando un paciente sintomático tiene resultados negativos para los biomarcadores virales o bacterianos, es mucho más probable que tenga una reacción de hipersensibilidad subyacente, tal como asma, fiebre del heno o exacerbación de la COPD. Los virus y

algunas bacterias pueden inducir esta reacción alérgica sin causar una enfermedad invasiva. Sin los biomarcadores, a estos pacientes se les diagnosticaría una afección infecciosa primaria que probablemente conduciría a un tratamiento excesivo. También se describe en la presente descripción la inclusión de biomarcadores alérgicos tales como IgE sérica total.

Diversos estudios demostraron que la producción de IFN antivirales innatos tipo I y tipo III en células epiteliales bronquiales de pacientes con asma se reduce en comparación con los niveles secretados por las células de las vías respiratorias inferiores de pacientes sin asma después de una infección por HRV (Wark y otros, *J Exp Med.* 201: 937-947, 2005; Baraldo y otros, *J Allergy Clin Immunol.* 130:1307-1314, 2012). Esta respuesta antiviral deteriorada se correlacionó inversamente con cantidades crecientes de ARN-VHR detectadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en sobrenadantes de cultivos (Wark 2005; Baraldo 2012). En otros dos estudios, la secreción de IFN innatos de las células dendríticas plasmocitoides en la sangre periférica disminuyó significativamente en las células de sujetos con asma en comparación con aquellos sin asma después de la estimulación con influenza en un estudio, o HRV en el otro (Gill y otros, *J Immunol.* 184: 5999-60006, 2010; Durrani y otros, *J. Allergy Clin Immunol.* 130: 489-495, 2012). Adicionalmente, la producción de estas citocinas se correlacionó inversamente con los niveles séricos de IgE o la expresión de FcεR1α en las células dendríticas plasmocitoides, y el entrecruzamiento de la IgE en las células dendríticas plasmocitoides antes de la estimulación con influenza o HRV disminuyó aún más esta respuesta innata. En conjunto, estas observaciones sugieren que las personas con asma pueden correr riesgo de sufrir cargas virales más altas y síntomas que afectan sus vías respiratorias durante la infección por HRV. Aunque en el asma intervienen varios tipos de citocinas, no se encontraron hallazgos de una mayor producción de IFN tipo I en la exacerbación aguda. Por lo tanto, la proteína MxA que se encuentra inducida y elevada en pacientes con asma probablemente sería causada por una infección viral invasiva, mientras que esto no puede ocurrir secundariamente por otras citocinas asociadas con la inflamación alérgica (Chung y Barnes, *Thorax*, 55: 825-857, 1999).

En el estudio de exposición al RV-16, Zambrano y otros (Zambrano y otros, *J Allergy Clin Immunol.* 111(5): 1008-1116, mayo 2003) informaron que los sujetos con asma y niveles altos de IgE total tenían síntomas de las vías respiratorias inferiores que eran significativamente mayores que los síntomas informados por los sujetos con asma y niveles bajos de IgE o por los sujetos de control sin asma, a pesar de tener cargas virales que, en cualquier caso, disminuían durante la infección en la evaluación. Adicionalmente, los sujetos con asma con niveles altos y bajos de IgE tenían síntomas de las vías respiratorias (tanto superiores como inferiores) que aumentaron en comparación con los sujetos de control durante el período de resolución de los síntomas, aunque las cargas virales no fueron significativamente diferentes de las de los sujetos de control sin asma. En conjunto, los resultados indican que no es probable que la carga viral influya en la persistencia de los síntomas en los sujetos con asma, lo que apoya la hipótesis de que la prolongación de los síntomas puede resultar de la amplificación de la inflamación alérgica provocada por HRV.

Está claro que la mayoría de los niños y adultos que experimentan exacerbaciones inducidas por HRV son atópicos y tienen títulos elevados de anticuerpos IgE séricos contra alérgenos, como los ácaros del polvo, que se demostró que aumentan significativamente el riesgo de sibilancias con HRV (Soto-Quiros y otros, *J Allergy Clin Immunol.* 129:1499-1505, e5, 2012; Duff y otros, *Pediatrics* 92; 535-540, 1993; Green y otros, *BMJ* 324:763, 2002).

Una de las características cardinales del asma es la hiperreactividad de las vías respiratorias, que se define como el aumento de la sensibilidad de las vías respiratorias pequeñas a la broncoconstricción en respuesta a sustancias inhaladas, tales como histamina o metacolina. Por lo tanto, es de gran interés que las infecciones respiratorias virales puedan aumentar transitoriamente la capacidad de respuesta de las vías respiratorias en humanos y animales. El uso de una infección inducida experimentalmente de voluntarios con HRV o virus de la influenza permitió el examen longitudinal de la fisiología pulmonar antes, durante y después de las infecciones. Cheung y otros inocularon a 14 sujetos con asma leve con HRV-16 (rinovirus tipo 16) o placebo y encontraron que la capacidad de respuesta de las vías respiratorias aumentó transitoriamente durante la infección aguda y volvió a los niveles iniciales 1 semana después de la inoculación. En adición a aumentar la sensibilidad de las vías respiratorias, la infección por HRV-16 aumentó la respuesta máxima a la metacolina inhalada y, por el contrario a los cambios en la capacidad de respuesta de las vías respiratorias, las respuestas máximas permanecieron elevadas hasta 15 días después de la infección aguda. Por lo tanto, las infecciones virales pueden aumentar tanto la reactividad de las vías respiratorias inferiores como la magnitud de la broncoconstricción en respuesta a sustancias contráctiles inhaladas en el asma, y este último efecto puede persistir durante semanas después de la infección aguda (Cheung y otros, *Rhinovirus inhalation causes long-lasting excessive airway narrowing in response to methacholine in asthmatic subjects in vivo.* *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995. 152:1490-1496).

Existe evidencia de que la alergia y el asma pueden influir en el efecto de la infección viral respiratoria sobre la capacidad de respuesta de las vías respiratorias. La infección experimental con HRV-16 induce mayores cambios en la capacidad de respuesta de las vías respiratorias en voluntarios con alergia respiratoria (Bardin y otros, *Eur. Respir. J.* 9: 2250-2255, 1996; Gern y otros, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:1872-1876, 1997) o asma alérgica leve que en sujetos de control normales (Fraenkel y otros, *Am J Respir. Crit. Care Med.* 151:879-886, 1997). Wiselka y otros evaluaron su eficacia para la prevención de infecciones por virus respiratorios y las complicaciones resultantes en pacientes con enfermedad pulmonar crónica. No se observaron efectos beneficiosos del IFN-α en esta población de pacientes con asma y COPD (Wiselka y otros, *Thorax* 46:706-11, 1991), que puede relacionarse con la respuesta alérgica primaria impulsada por IgE y menos con una respuesta infecciosa directa.

Las cargas virales entre los niños con y sin asma fueron similares y lo mismo ocurrió entre los adultos que se infectaron con HRV de forma experimental. En conjunto, estos estudios sugieren que la respuesta asmática al RV probablemente sea el resultado de vías inflamatorias que son amplificadas o provocadas independientemente por el HRV, en lugar de una mayor carga viral en las vías respiratorias del asmático (Kennedy y otros, Am J Respir Crit Care Med. 189(5): 532-9, 2014).

La mayoría de las exacerbaciones del asma se inician por enfermedades virales de las vías respiratorias superiores. No está claro si las exacerbaciones inducidas por HRV se asocian con una mayor replicación viral e inflamación neutrofílica en comparación con los resfriados por HRV. La ausencia de grandes diferencias en la carga viral entre los grupos sugiere una sensibilización diferencial de las vías respiratorias inferiores a los efectos de la inflamación neutrofílica en los pacientes que sufren exacerbaciones. Se estudió a un total de 52 personas con asma y 14 sujetos de control sin atopía ni asma durante más de 10 semanas por sujeto en promedio; 25 participantes desarrollaron una exacerbación del asma. La detección de HRV en los 5 días anteriores fue la exposición atribuible más común relacionada con la exacerbación. En comparación con otras infecciones, las causadas por un grupo A de HRV menor tenían 4,4 veces más probabilidades de causar exacerbación ( $P = 0,038$ ) (Denlinger y otros, Am J Respir Crit Care Med. 184(9): 1007-14, 2011).

Mediante el uso de PCR junto con pruebas de diagnóstico viral estándar, Johnston y otros determinaron que entre el 80 y el 85 % de los niños en edad escolar con episodios de sibilancias dieron positivo a un virus y que el virus detectado con mayor frecuencia fue el HRV (Johnston y otros, Br. Med. J. 310:1226-1229, 1995) seguido del coronavirus. Además, aproximadamente la mitad de las exacerbaciones en adultos con asma se asocian con la infección por HRV (Nicholson y otros, Br. Med. J. 307: 982-986, 1993). Además, el asma inducida por virus puede ser grave: los patrones estacionales de prevalencia de virus de las vías respiratorias superiores se correlacionan estrechamente con los ingresos hospitalarios por asma, especialmente en niños (Johnston y otros, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154:654-660, 1996). Además, el HRV y otros virus respiratorios se detectan con frecuencia en niños hospitalizados por asma. En conjunto, estos estudios indican que las infecciones virales, y particularmente las enfermedades respiratorias causadas por HRV, son la causa más común de exacerbaciones del asma en niños y también contribuyen sustancialmente a la morbilidad del asma en adultos.

El solicitante realizó pruebas ELISA de MxA (mediante el uso de las pruebas ELISA de MxA con marca CE disponibles comercialmente de Biovender) en muestras que se confirmaron que eran positivas para rinovirus mediante el uso del sistema de PCR BioFire™. Los datos cuantitativos demuestran que el rinovirus solo se elevó por encima de 40 ng/ml en 3/51 pacientes o el 5,9 % de los sujetos, independientemente de la edad, que dieron positivo en Biofire PCR, como se ve en la Tabla 4. La Tabla 4 muestra la edad del paciente, que todas las muestras fueron positivas en la prueba de PCR BioFire™, y el resultado del ELISA de MxA.

Tabla 4

Edad	Rinovirus PCR BioFire	Resultado ELISA de MxA (ng/ml)
3	POSITIVO	34,573
3	POSITIVO	29,817
3	POSITIVO	0,263
4	POSITIVO	72,908
4	POSITIVO	36,894
4	POSITIVO	0,03
6	POSITIVO	0,03
7	POSITIVO	0,03
8	POSITIVO	0,03
10	POSITIVO	13,606
10	POSITIVO	0,03
11	POSITIVO	11,07
11	POSITIVO	1,213
14	POSITIVO	42,426
16	POSITIVO	9,608
16	POSITIVO	0,378
19	POSITIVO	9,804
19	POSITIVO	0,063
20	POSITIVO	2,177
21	POSITIVO	1,063
21	POSITIVO	0,301
23	POSITIVO	20,53
23	POSITIVO	2,065
24	POSITIVO	12,595
25	POSITIVO	22,185
25	POSITIVO	10,299

25	POSITIVO	0,03
29	POSITIVO	20,189
31	POSITIVO	0,538
32	POSITIVO	2,196
33	POSITIVO	19,127
33	POSITIVO	0,03
34	POSITIVO	2,988
34	POSITIVO	1,539
36	POSITIVO	1,245
37	POSITIVO	32,068
39	POSITIVO	26,269
40	POSITIVO	8,716
40	POSITIVO	3,428
41	POSITIVO	47,396
44	POSITIVO	0,03
46	POSITIVO	2,438
48	POSITIVO	16,148
48	POSITIVO	1,987
50	POSITIVO	4,507
52	POSITIVO	0,72
52	POSITIVO	0,595
59	POSITIVO	13,953
59	POSITIVO	0,33
60	POSITIVO	28,834
63	POSITIVO	6,477

La diferenciación entre infección y colonización requiere la demostración de una respuesta de anticuerpos al organismo y está sujeta a resultados falsos negativos después de una terapia antibiótica inmediata y adecuada (Gerber, y otros, 1988. The group A streptococcal carrier state. A reexamination. Am. J. Dis. Child. 142:562-565). No es práctico desarrollar respuestas de anticuerpos para diferenciar clínicamente la colonización de la infección verdadera; por lo tanto, se necesita otra respuesta inmune. Es muy poco probable que los pacientes con evidencia clínica de infección pero niveles normales de procalcitonina tengan una infección causada por una bacteria patógena (Gilbert, Use of plasma procalcitonin levels as an adjunct to clinical microbiology. J Clin Microbiol. 2010 julio;48(7):2325-9).

La evidencia soporta el uso de procalcitonina para: diferenciar los diagnósticos respiratorios bacterianos de los virales, ayudar a estratificar el riesgo de los pacientes y guiar las decisiones de terapia con antibióticos sobre la necesidad inicial y la duración óptima de la terapia (Schuetz y otros, Role of procalcitonin in managing adult patients with respiratory tract infections. Chest. 2012 abril;141(4):1063-73).

El título de antiestreptolisina O (ASO) es un análisis de sangre para medir los anticuerpos contra la estreptolisina O, una sustancia producida por la bacteria estreptococo del grupo A. La presencia de una respuesta inmune a antígenos somáticos o extracelulares de GAS aún es el medio más confiable para documentar una infección auténtica. Aproximadamente el 60 % de los pacientes con cultivos positivos del grupo A tuvieron una elevación de antiestreptolisina O (ASO) y anti DNasa B (ADB), lo que confirma una respuesta inmune. Un ejemplo importante es el estado de portador estreptocócico de las vías respiratorias superiores con persistencia de GAS faríngeo durante períodos de unas pocas semanas a muchos meses, acompañado de títulos de anticuerpos elevados, pero no crecientes. Si un portador de este tipo desarrollara dolor de garganta debido a otra etiología, por ejemplo, un único cultivo positivo y/o determinación de anticuerpos muy probablemente llevaría al médico clínico o al epidemiólogo a una asociación falsa positiva con GAS (Johnson y otros, 2010. The human immune response to streptococcal extracellular antigens: clinical, diagnostic, and potential pathogenetic implications. Clin Infect Dis. 2010 febrero 15;50(4):481-90). Para superar las posibles limitaciones de la procalcitonina para que sirva como único diferenciador de la colonización, en algunas modalidades, se realiza la adición de títulos de anticuerpos antiestreptolisina.

En una modalidad, la presencia del anticuerpo antiestreptolisina O se usa en asociación con valores elevados de procalcitonina para definir una infección verdadera, ya que la presencia del anticuerpo antiestreptolisina O respalda la existencia de una respuesta inmune.

Los títulos de anticuerpos antiestreptocócicos (ASO) no tienen valor en el diagnóstico de faringitis aguda por GAS, pero son útiles en estudios epidemiológicos prospectivos para diferenciar las infecciones verdaderas por GAS de los portadores de GAS. La determinación de anticuerpos antiestreptolisina O solía ser la base para confirmar el diagnóstico de faringitis por GAS. La demostración de un aumento significativo o de cuatro veces en el título en muestras de suero emparejadas tomadas con un intervalo de 7 a 14 días indicará una infección aguda o en curso (Johnson y otros, Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections. World Health Organization, Geneva, 1996). Por otro lado, la presencia de GAS en la garganta en ausencia de un aumento significativo de anticuerpos indica un

estado de portador y no una infección por GAS. Las dificultades prácticas para obtener dos muestras de suero y el tiempo necesario para demostrar un aumento de cuatro veces en el título hacen que esto sea inviable de forma rutinaria. Por ejemplo, no siempre es posible obtener una segunda muestra para determinar el título, particularmente en los países en desarrollo, donde la fiebre reumática aguda es la más común. Por lo tanto, se acepta generalmente que si solo se dispone de una única muestra, un título mayor que el límite superior normal en la prueba inicial puede considerarse evidencia presuntiva de una infección estreptocócica previa (Kaplan y otros, J. Infect. Dis. 123: 490-501, 1971; Klein y otros, Appl. Microbiol. 21:999-1001, 1971; Wannamaker y Ayoub, Circulation 21: 598-614, 1960). Alternativamente, el título obtenido con una única muestra de suero puede interpretarse con base en un valor de corte definido como el límite superior normal (ULN). El ULN representa el nivel más alto de anticuerpos que puede observarse en el 20 % de las personas normales que tienen anticuerpos demostrables. Cualquier título de ASO por encima de estos valores de corte sugeriría una infección por GAS (Brahmadathan y Gladstone, Indian J Med Microbiol., 24(2): 92-6, abril 2006).

El límite superior normal para la serología estreptocócica se definió mediante la separación del 20 % superior del 80 % inferior de la distribución del grupo de forma dicotómica (Ayoub y Wannamaker, Pediatrics 29: 527-538, 1962;; Klein, 1971; Wannamaker 1960). La elección del límite del percentil 80 en lugar de los cálculos más tradicionales del límite superior normal (por ejemplo, 2 desviaciones estándar de la media) se basa en estudios que encontraron que más del 80 al 90 % de los pacientes con fiebre reumática aguda o glomerulonefritis estreptocócica posparto tienen títulos estreptocócicos superiores al percentil 80 en los controles sanos sin evidencia clínica de infección estreptocócica reciente (Ayoub 1962; Wannamaker 1960). Por lo tanto, se supone que en cualquier población una proporción de individuos aparentemente sanos tuvieron una infección subclínica reciente por GAS (Ayoub 1962). En los países desarrollados, donde el impétigo causado por GAS es poco común, los títulos de estreptococos en la población reflejan principalmente la incidencia de infección faríngea por GAS; por lo tanto, los títulos en personas sanas son bajos en la primera infancia, alcanzan un máximo en niños de 5 a 15 años, disminuyen al final de la adolescencia y principios de la edad adulta, y después se estabilizan. Se definieron los ULN de EE. UU. Los títulos estimados que eran el 80 % del límite superior o normal a la edad de 10 años fueron 276 UI/ml para ASO que es similar a otros valores informados (Kaplan y otros, Pediatrics 101:86-88, 1998; Steer y otros, Clin Vaccin Immunol 16(2): 172-5, febrero 2009).

La Tabla 5 muestra las diferencias entre contaminación, colonización e infección activa (adaptada de Lorrot M y otros, Procalcitonin in pediatric emergencies: comparison with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon alpha in the differentiation between bacterial and viral infections. Presse Med 2000;29:128-134). Los valores normales de WBC, IgG y proteína C reactiva excluyeron las infecciones bacterianas con un valor predictivo del 100 % en niños que presentaban fiebre. Lorrot comparó la procalcitonina con la proteína C reactiva, la interleucina-6 y el interferón-alfa. Los niveles de MxA (una forma de medir la respuesta inmune del hospedero) no se midieron en el estudio de Lorrot.

Tabla 5

Condición	Detección de ADN	Crecimiento del cultivo	Detección de antígenos	Respuesta inmune del hospedero
Contaminación	No	Sí	No	No
Colonización (estado portador)	Sí	Sí	Sí	No
Infección activa	Sí	Sí	Sí	Sí

Los principales patógenos bacterianos de las infecciones de las vías respiratorias superiores se muestran en la Tabla 6 (Bisno y otros, Clin Infect Dis 2002;15;35(2):113-25; Wenzel y Fowler. Clinical practice: acute bronchitis. N Engl J Med 2006; 355:2125-30). Los principales patógenos bacterianos de las infecciones de las vías respiratorias inferiores incluyen *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Staph. aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella* spp, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp, *Anaerobes*, *Pneumocystis* spp, *M. Tuberculosis*, *C. psittaci* y *C. burnetii* (File TM. Community Acquired Pneumonia. Lancet. 2003;362:1991-2001).

Tabla 6

Patógenos bacterianos primarios	Síndrome	Prevalencia estimada
Patógenos bacterianos		
<i>Streptococcus pyogenes</i>		
Estreptococo β-hemolítico del grupo A	Faringitis, amigdalitis y escarlatina	5 % - 30 % (5 % - 10 % en adultos; 15 - 30 % en niños)
Estreptococo β-hemolítico del grupo C	Faringitis y amigdalitis	> 5 %
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Faringitis	< 1 % (raro)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria	< 1 % (raro)
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	Faringitis y erupción escarlatíniforme	< 1 % (raro)
Patógenos bacterianos atípicos		
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Neumonía, bronquitis y faringitis	5 %*

Mycoplasma pneumoniae	Neumonía, bronquitis y faringitis	< 1 %*
Bordetella pertussis	Neumonía, bronquitis y faringitis	< 1 %*
* Menos del 10 % para los 3 patógenos combinados		

En las pruebas rápidas actuales para estreptococos, la sensibilidad de la prueba de detección rápida de antígenos (RADT) estreptocócica está en el intervalo entre 70-90 por ciento y la especificidad está en el intervalo entre 90-100 por ciento en múltiples estudios (Del Mar y otros, Antibiotics for sore throat. Cochrane Database Syst Rev. 2006 octubre 18;(4):CD000023; Gerber MA y Shulman ST. Rapid diagnosis of pharyngitis caused by group A streptococci. Clin Microbiol Rev 2004; 17:571; Gieseke y otros, Comparison of two rapid Streptococcus pyogenes diagnostic tests with a rigorous culture standard. Pediatr Infect Dis J 2002; 21:922; Nakhoul y Hickner, Management of adults with acute streptococcal pharyngitis: minimal value for backup strep testing and overuse of antibiotics. J Gen Intern Med 2013; 28:830; Tanz y otros, Performance of a rapid antigen-detection test and throat culture in community pediatric offices: implications for management of pharyngitis. Pediatrics 2009; 123:437). En un metaanálisis de 159 estudios que evaluaron las pruebas rápidas de antígenos de la influenza, la sensibilidad combinada fue del 62,3 por ciento (CI del 95 %: 57,9-66,6 por ciento) y la especificidad combinada fue del 98,2 por ciento (CI del 95 %: 97,5-98,7 por ciento). La sensibilidad fue menor en adultos que en niños (53,9 versus 66,6 por ciento) y mayor para la influenza A que para la influenza B (64,6 versus 52,2 por ciento) (Chartrand y otros, Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis. Ann Intern Med 2012; 156:500).

Dado que la procalcitonina puede encontrarse en el suero de una persona sana (< 0,12 ng/ml) y los ensayos actuales demuestran una precisión entre ensayos de aproximadamente el 10 % (Aouifi y otros, Usefulness of procalcitonin for diagnosis of infection in cardiac surgical patients. Crit Care Med 2000; 28:3171-6), un límite recomendado para una infección bacteriana definitiva es 0,15 ng/ml.

La Clínica Mayo reafirmó esta recomendación al afirmar que, en niños mayores de 72 horas y en adultos, niveles < 0,15 ng/ml hacen improbable un diagnóstico de infección bacteriana significativa (<http://www.mayomedicallaboratories.com/testcatalog/Clinical+and+Interpretive/83169>).

Además, la procalcitonina entre 0,15 y 0,25 ng/ml no excluye una infección, porque las infecciones localizadas (sin signos sistémicos) pueden asociarse con niveles tan bajos. Para aumentar la posibilidad de una identificación positiva de una infección bacteriana, el nivel de WBC se relaciona con esta procalcitonina elevada para la infección bacteriana y la procalcitonina elevada  $\geq 0,15$  ng/ml y < 0,25 ng/ml en presencia de un nivel bajo de WBC se considerará viral. En pacientes con un nivel de procalcitonina inferior a 0,15 ng/ml, el diagnóstico de una infección bacteriana de las vías respiratorias se considera muy improbable y se desaconseja el uso de antibióticos. En pacientes con un nivel de procalcitonina superior a 0,25 ng/ml, se considera que el diagnóstico más probable es una infección bacteriana de las vías respiratorias y se recomienda el uso de antibióticos (Clínica Mayo).

Durante un ensayo clínico multicéntrico, los expertos determinaron la presencia de una verdadera infección bacteriana activa a partir de una colonización con cultivo positivo mediante la presencia de procalcitonina elevada  $\pm$  un recuento de WBC elevado  $\geq 15\,000$ . Los resultados se muestran en la Tabla 7. Los valores de WBC se muestran en miles en la tabla. Si bien todos los pacientes dieron positivo en bacterias en un cultivo de garganta, el diagnóstico final para 21 de los 26 pacientes fue un diagnóstico negativo o colonización. Ninguno de esos 21 pacientes tenía recuentos de WBC superiores o iguales a 15 000 ni niveles de procalcitonina superiores a 0,10 ng/ml o, si los recuentos de WBC eran inferiores a 15 000, niveles de procalcitonina superiores a 0,15 ng/ml. Los pacientes 5, 7 y 8, cada uno de los cuales tenía niveles de WBC de 12 180, 12 350 y 12 200, respectivamente, tenían niveles de procalcitonina de 0,19 ng/ml, 0,37 ng/ml y 0,38 ng/ml, respectivamente. A cada uno de estos pacientes se les diagnosticó una infección bacteriana debido a que sus niveles de procalcitonina estaban elevados por encima de 0,15 ng/ml. Al paciente 6, que tenía niveles de WBC de 17 100 y un nivel de procalcitonina de 0,2 ng/ml, también se le diagnosticó una infección bacteriana. Al paciente 26, que tenía niveles de WBC de 16 690, 2 bandas y un nivel de procalcitonina de 0,74 ng/ml, también se le diagnosticó una infección bacteriana.

Tabla 7

Paciente	WBC	Bandas	Resultado de procalcitonina (ng/ml)	Organismo de cultivo de garganta aislado	Diagnóstico final
1	7,5	0	0,05	<i>Streptococo beta hemolítico del grupo A</i>	Negativo
2	8,7	0	0,05	<i>Streptococo beta hemolítico del grupo A</i>	Negativo
3	11	0	0,05	<i>Streptococo beta hemolítico del grupo A</i>	Negativo
4	3,41	0	0,05	<i>Streptococo beta hemolítico del grupo A</i>	Negativo
5	12,18	0	0,19	<i>Streptococo beta hemolítico del grupo A</i>	Bacteriana
6	17,1	0	0,2	<i>Streptococo beta hemolítico del grupo A</i>	Bacteriana
7	12,35	0	0,37	<i>Streptococo beta hemolítico del grupo A</i>	Bacteriana
8	12,2	0	0,38	<i>Streptococo beta hemolítico del grupo A</i>	Bacteriana
9	9,31	0	0,05	<i>Streptococo beta hemolítico del grupo A</i>	Negativo

10	8,5	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
11	9,83	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
12	9,67	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
13	10,82	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
14	7,44	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
15	10,1	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
16	12,7	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
17	8,36	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
18	5,45	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
19	10,49	0	0,06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
20	9	0	0,07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
21	9	0	0,08	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
22	5,1	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
23	4,1	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
24	11,57	0	0,13	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
25	16,69	2	0,74	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriana
26	8,37	0	0,05	<i>Staphylococcus aureus</i>	negativo

La Tabla 8 muestra cómo puede usarse la procalcitonina en las modalidades descritas en la presente descripción para determinar una infección o colonización viral o bacteriana activa. Si no se detectan patógenos virales o bacterianos y el nivel de procalcitonina es inferior a 0,15 ng/ml, el diagnóstico es que no hay infección bacteriana ni viral. Si solo se detecta un patógeno viral y el nivel de procalcitonina es inferior a 0,15 ng/ml, el diagnóstico es infección viral. En algunas modalidades, esto se confirma, preferentemente, mediante pruebas de un nivel de  $\geq 25$  ng/ml de MxA en la muestra. En otras modalidades, esto se confirma, preferentemente, mediante pruebas de un nivel que está en el intervalo entre 15 ng/ml y 40 ng/ml en la muestra. Si solo se detecta un patógeno bacteriano, pero el nivel de procalcitonina es inferior a 0,15 ng/ml, el diagnóstico es colonización bacteriana por patógenos no primarios. Si solo se detecta un patógeno bacteriano y el nivel de procalcitonina es superior o igual a 0,10 ng/ml, el diagnóstico es infección bacteriana por patógenos primarios. Si solo se detecta un patógeno bacteriano y el nivel de procalcitonina es superior o igual a 0,15 ng/ml, el diagnóstico es infección bacteriana por patógenos no primarios. Si se detecta un patógeno bacteriano y viral, y el nivel de procalcitonina es superior o igual a 0,10 ng/ml, el diagnóstico es coinfección viral y bacteriana, la infección bacteriana es de patógenos primarios. En algunas modalidades, esto se confirma, preferentemente, mediante pruebas de un nivel de  $\geq 25$  ng/ml de MxA en la muestra. En otras modalidades, esto se confirma, preferentemente, mediante pruebas de un nivel que está en el intervalo entre 15 ng/ml y 40 ng/ml en la muestra. Si se detecta un patógeno tanto bacteriano como viral, y el nivel de procalcitonina es superior o igual a 0,15 ng/ml, el diagnóstico es coinfección viral y bacteriana, la infección bacteriana es por patógenos no primarios. En algunas modalidades, esto, preferentemente, se confirma adicionalmente mediante la comprobación de un nivel de  $\geq 25$  ng/ml de MxA en la muestra. En otras modalidades, esto, preferentemente, se confirma adicionalmente mediante la comprobación de un nivel que está en el intervalo entre 15 ng/ml y 40 ng/ml en la muestra.

Tabla 8

Patógeno bacteriano detectado	Patógeno viral detectado	Nivel de procalcitonina ng/ml	Interpretación
No	No	< 0,15	No hay evidencia de infección bacteriana o viral
No	Sí	< 0,15	Infección viral
Sí	No	< 0,15	Colonización bacteriana (patógenos no primarios)
Sí	No	$\geq 0,10$	Infección bacteriana (patógenos primarios)
Sí	No	$\geq 0,15$	Infección bacteriana (patógenos no primarios)
Sí	Sí	$\geq 0,10$	Coinfección viral y bacteriana (primaria)
Sí	Sí	$\geq 0,15$	Coinfección viral y bacteriana (no primaria)

Una prueba de diferenciación rápida en el punto de atención (POC) tiene profundas implicaciones clínicas, ya que se demostró que distinguir las infecciones virales de las bacterianas es un desafío, especialmente en las primeras etapas del proceso de la enfermedad (Metlay y Fine. Testing strategies in the initial management of patients with community-acquired pneumonia. Ann Intern Med. 2003; 138(2): 109-118.; Martin y otros, The epidemiology of sepsis in the united states from 1979 through 2000. N Engl J Med. 2003;348:1546-1554. doi: 10.1056/NEJMoa022139). Van Gageldonk-Lafeber y otros no observaron ninguna asociación entre los patógenos bacterianos y virales detectados y los diagnósticos realizados por los médicos generales (GP) o los síntomas informados por los sujetos (van Gageldonk-Lafeber y otros, A case-control study of acute respiratory tract infection in general practice patients in the netherlands.

Clin Infect Dis. 2005;41(4):490-497). Además, se demostró que el examen físico por sí solo tiene una sensibilidad del 50 % al 70 % y una especificidad del 60 % al 75 % (Lieberman y otros, Aetiology of respiratory tract infections: Clinical assessment versus serological tests. Br J Gen Pract. 2001;51(473):998-1000, incorporado en la presente descripción como referencia) así como también un valor predictivo negativo y positivo del 50 % al 60 % (Lähde y otros, HRCT findings in the lungs of primary care patients with lower respiratory tract infection. Acta Radiol. 2002;43(2):159-163). La dificultad para establecer un diagnóstico etiológico ambulatorio en la enfermedad respiratoria febril aguda se debe a la superposición de signos y síntomas, las limitaciones de las pruebas de diagnóstico disponibles, los regímenes de tratamiento empírico y el retraso en recibir los resultados de las pruebas de laboratorio.

De acuerdo con Korppi, la medición de la proteína C reactiva se recomienda como método de primera línea para detectar sospechas de inflamación bacteriana (Korppi y otros, White blood cells, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in pneumococcal pneumonia in children. Eur Respir J. 1997;10(5):1125-1129). Diversos estudios indicaron que la proteína C reactiva es factible y exacta para diferenciar la neumonía de la bronquitis aguda (van der Meer y otros, Diagnostic value of C reactive protein in infections of the lower respiratory tract: Systematic review. BMJ. 2005;331(7507):26. doi: 10.1136/bmj.38483.478183.EB; Hopstaken y otros, Contributions of symptoms, signs, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein to a diagnosis of pneumonia in acute lower respiratory tract infection. Br J Gen Pract. 2003;53(490):358-364; Flanders y otros, Performance of a bedside c-reactive protein test in the diagnosis of community-acquired pneumonia in adults with acute cough. Am J Med. 2004;116(8):529-535; Melbye y otros, Diagnosis of pneumonia in adults in general practice. relative importance of typical symptoms and abnormal chest signs evaluated against a radiographic reference standard. Scand J Prim Health Care. 1992;10(3):226-233). La neumonía se asocia con niveles elevados de proteína C reactiva sérica superiores a 10 mg/l, mientras que la neumonía grave tiene proteínas C reactiva sérica típicamente superiores a 100 mg/l (Smith y Lipworth, C-reactive protein in simple community-acquired pneumonia. Chest. 1995;107(4):1028-1031; Chalmers y otros, C-reactive protein is an independent predictor of severity in community-acquired pneumonia. Am J Med. 2008;121(3):219-225). En Escandinavia, la prueba de proteína C reactiva POC es parte de la evaluación de rutina de pacientes con LRTI y su uso demostró ser rentable (Diederichsen y otros, Randomised controlled trial of C-reactive protein rapid test as a guide to treatment of respiratory infections in general practice. Scand J Prim Health Care. 2000;18(1):39-43; Dahler-Eriksen y otros, Near-patient test for C-reactive protein in general practice: Assessment of clinical, organizational, and economic outcomes. Clin Chem. 1999;45(4):478-485. 42, 43).

Tanto las concentraciones de proteína C reactiva como de procalcitonina (PCT) se usaron para iniciar y monitorear el uso de antibióticos para las LRTI (Cals y otros, Effect of point of care testing for C reactive protein and training in communication skills on antibiotic use in lower respiratory tract infections: Cluster randomised trial. BMJ. 2009;338:b1374. doi: 10.1136/bmj.b1374; Schuetz y otros, Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections: The ProHOSP randomized controlled trial. JAMA. 2009;302(10):1059-1066. doi: 10.1001/jama.2009.1297). Se sugirió la procalcitonina (Briel y otros, Procalcitonin-guided antibiotic use vs a standard approach for acute respiratory tract infections in primary care. Arch Intern Med. 2008;168(18):2000-7; discussion 2007-8) para monitorear infecciones ambulatorias adquiridas en la comunidad, pero como no está disponible como prueba POC, los costos de medir la procalcitonina son relativamente más altos, lo que la hace indeseable para infecciones de alta incidencia en la práctica familiar (Cals y otros, Procalcitonin-based guidelines and lower respiratory tract infections. JAMA. 2010;303(5):418. doi: 10.1001/jama.2010.52). En general, la especificidad de los biomarcadores individuales en términos de distinción etiológica entre infecciones bacterianas y virales aún es un problema (Simon y otros, Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis. 2004;39(2):206-217. doi: 10.1086/421997; Oshita y otros, Semi-quantitative procalcitonin test for the diagnosis of bacterial infection: Clinical use and experience in japan. J Microbiol Immunol Infect. 2010;43(3):222-227). La proteína C reactiva como biomarcador único es un parámetro útil y altamente específico para sugerir la etiología bacteriana de una infección en altas concentraciones, pero a menudo se observan concentraciones más bajas de proteína C reactiva durante infecciones virales y bacterianas (ten Oever y otros, Combination of biomarkers for the discrimination between bacterial and viral lower respiratory tract infections. J Infect Dis. 2012;65(6):490-495). Los intentos de realizar pruebas de panel, que incluyen la proteína C reactiva combinada con IL-18 debido a su función en la inmunidad antiviral, no tuvieron éxito en diferenciar la infección viral de la bacteriana (ten Oever y otros, 2012).

Los niveles más altos de MxA en pacientes con infección viral en comparación con pacientes con infección bacteriana pueden explicarse por el hecho de que la proteína MxA se induce exclusivamente por IFN tipo 1 y no por IFN-gamma, IL-1, TNF-alfa o cualquiera de las otras citocinas inducidas por infección bacteriana (Simon y otros, Interferon-regulated mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines. J Virol. 1991;65(2):968-971). Los niveles séricos de IFN tipo 1 se mantienen dentro de los límites normales, incluso en pacientes con infecciones bacterianas graves (Calandra y otros, Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. swiss-dutch J5 immunoglobulin study group. J Infect Dis. 1990;161(5):982-987; Girardin E, Grau GE, Dayer JM, Roux-Lombard P, Lambert PH. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. N Engl J Med. 1988;319(7):397-400. doi: 10.1056/NEJM198808183190703). Hay datos sustanciales que demuestran que la infección humana por el virus respiratorio sincitial (RSV), influenza, adenovirus y metapneumovirus estimulan una fuerte respuesta de citocinas que incluye interferón gamma (Melendi y otros, Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus or influenza virus in infants. Pediatrics. 2007;120(2):e410-e415; Sato y



otros, Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children. *Cytokine*. 2009;47(1):65-68). La magnitud de la respuesta del IFN varía según el tipo de virus desencadenante (Melendi y otros, 2007). Además, se informó que una deficiencia en el receptor de IFN aumenta la gravedad de la infección viral respiratoria (Lee y otros, IFN-gamma production during initial infection determines the outcome of reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Resp Crit Care Med*. 2008;177(2):208-218).

Se descubrió que MxA está elevado en infecciones virales respiratorias comunes, así como también en infecciones virales gastrointestinales comunes (Forster y otros, MxA protein in infants and children with respiratory tract infection. *Acta Paediatr*. 1996;85(2):163-167; Halminen y otros, Expression of MxA protein in blood lymphocytes discriminates between viral and bacterial infections in febrile children. *Pediatr Res*. 1997;41(5):647-650; Chieux y otros, The MxA protein levels in whole blood lysates of patients with various viral infections. *J Virol Methods*. 1998;70(2):183-191.25-27; Chieux y otros, MxA protein in capillary blood of children with viral infections. *J Med Virol*. 1999;59(4):547-551; Nakabayashi y otros, MxA-based recognition of viral illness in febrile children by a whole blood assay. *Pediatr Res*. 2006;60(6):770-774; Kawamura y otros, New sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay for human MxA protein in a whole blood using monoclonal antibodies against GTP-binding domain for recognition of viral infection. *J Clin Lab Anal*. 2012;26(3):174-183). Los cultivos bacterianos generalmente solo se realizan en casos de presunta infección grave, tales como la sospecha de neumonía, o cuando la consecuencia de omitir un diagnóstico puede provocar complicaciones graves, tales como la faringitis estreptocócica. Los cultivos bacterianos suelen ser difíciles de obtener, especialmente en niños o pacientes que no cooperan, y los cultivos virales no se realizan de forma rutinaria debido al importante retraso en la recepción de los resultados. Los nuevos paneles de detección viral de base molecular son útiles, pero son costosos y no proporcionan información en el lugar de atención. Adicionalmente, puede resultar difícil recolectar muestras de sangre venosa de niños en entornos de atención ambulatoria. Una prueba POC, que se realiza junto a la cama, presenta un resultado inmediato a partir de una gota de sangre y es especialmente útil en niños (Verbakel y otros, Analytical accuracy and user-friendliness of the afinion point-of-care C-reactive protein test. *J Clin Pathol*. 2014;67(1):83-86).

La alta sensibilidad de la PCR permite la detección de cantidades mínimas de ácidos nucleicos virales, pero la relevancia clínica de los resultados positivos de la prueba no está clara porque pequeñas cantidades de un virus respiratorio podrían representar una colonización asintomática o una diseminación posinfecciosa (Jansen y otros, Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: Toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol*. 2011;49(7):2631-2636). Cuando se comparan pacientes de control asintomáticos con pacientes con enfermedades respiratorias, la PCR detecta la presencia de virus en 19-44 % de los pacientes de control, lo que sugiere colonización transitoria o persistencia, más comúnmente asociada con rinovirus y coronavirus (van Gageldonk-Lafeber y otros, A case-control study of acute respiratory tract infection in general practice patients in the netherlands. *Clin Infect Dis*. 2005;41(4):490-497; Jansen y otros, Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: Toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol*. 2011;49(7):2631-2636; Rhedin y otros, Clinical utility of PCR for common viruses in acute respiratory illness. *Pediatrics*. 2014;133(3):e538-e545; van der Zalm y otros, Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr*. 2009;154(3):396-400.e1; van Bentem y otros, Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr Allergy Immunol*. 2003;14(5):363-370). Nokso-Koivisto demostró que el 81 % de los niños con muestras positivas para el virus tenían síntomas respiratorios previos o tenían familiares con síntomas respiratorios concurrentes (Nokso-Koivisto y otros, Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol*. 2002;66(3):417-420). Sin embargo, virus tales como el de la influenza, parainfluenza, metapneumovirus y RSV rara vez se detectan en sujetos asintomáticos y, cuando están presentes, sugieren una infección activa (Rhedin y otros, Clinical utility of PCR for common viruses in acute respiratory illness. *Pediatrics*. 2014;133(3):e538-e545; Mathisen y otros, Respiratory viruses in Nepalese children with and without pneumonia: A case-control study. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(8):731-735; Berkley y otros, Viral etiology of severe pneumonia among Kenyan infants and children. *JAMA*. 2010;303(20):2051-2057). Dado que todos estos virus parecen eliminarse rápidamente de las vías respiratorias después de una infección, la PCR es un método de diagnóstico adecuado para determinar su infección (Jartti y otros, New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev*. 2013;14(1):38-45).

El rinovirus se considera un patógeno relativamente leve que puede colonizar la mucosa nasal sin causar síntomas (van Bentem y otros, Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr Allergy Immunol*. 2003;14(5):363-370). Los virus como el rinovirus y el coronavirus causan el resfriado común y típicamente no causan una infección invasiva, fiebre en hospederos inmunocompetentes ni estimulan el IFN o MxA (Nokso-Koivisto y otros, Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol*. 2002;66(3):417-420; Johnston y otros, Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms. *J Clin Microbiol*. 1993;31(1):111-117). Esto sugiere que debe hacerse con cautela una inferencia causal basada en la detección de estos virus en pacientes sintomáticos. En particular, coronavirus y rinovirus deben interpretarse con discreción debido a las altas tasas de detección entre sujetos sanos. Todos los demás virus resultaron positivos en menos del 5 % de los pacientes (Rhedin y otros, Clinical utility of PCR for common viruses in acute respiratory illness. *Pediatrics*. 2014;133(3):e538-e545).

Las pruebas moleculares, pruebas de antígenos y cultivos celulares solo determinan la presencia o ausencia de un patógeno. No diferencian una infección auténtica de un estado de portador o de una colonización. Se requiere la

presencia de una respuesta sistémica para confirmar una verdadera infección activa. Un nuevo método de diagnóstico debe ser capaz de diferenciar entre el crecimiento de un cultivo de células bacterianas, una bacteria colonizadora, y una respuesta inmune del hospedero.

## 5 Métodos de diagnóstico clínico

La Figura 1 muestra un método clínico existente para el diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias superiores (100). Pueden tomarse hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos (102), se toma un medio de transporte viral (104) y puede someterse a PCR en tiempo real (106) o PCR de panel respiratorio (107) (por ejemplo PCR del panel respiratorio Biofire®). Si la IgM es positiva (108) en la PCR en tiempo real para el virus de Epstein barr, el diagnóstico (110) es una infección viral. Si la PCR de panel respiratorio es positivo para HSV, CMV, Rinovirus, Coronavirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza o RSV (118), el diagnóstico (110) también es una infección viral. Si la PCR de panel respiratorio es positivo para Bordetella, Chlamydia o Mycoplasma (116), el diagnóstico (120) es una infección bacteriana.

Una muestra alternativa que podría recogerse es una muestra de orina (112), recogida mediante un sistema de transporte de recogida de orina (114). Si la muestra de orina es positiva para antígeno de Pneumococcus o Legionella (122), el diagnóstico (120) es una infección bacteriana. Alternativamente, una muestra orofaríngea (124) puede someterse a cultivo celular, mediante el uso de un sistema de transporte de recogida de hisopos de cultivo (126). Cualquier bacteria con crecimiento  $> 10^6$  o cualquier crecimiento de estreptococo del grupo A (128) indica (120) una infección bacteriana.

Si las muestras son negativas para PCR, antígeno (130) y cultivo celular (132), se consideran microbiológicamente no confirmadas (134) y están sujetas a pruebas adicionales. Si los niveles de procalcitonina en la muestra son inferiores a 1,0 ng/ml y hay glóbulos blancos (136), el diagnóstico (146) es negativo. Si los niveles de procalcitonina están entre 0,1 ng/ml y 0,25 ng/ml más cualquier glóbulo blanco (138), el diagnóstico (154) es una infección viral. Si los niveles de procalcitonina están entre 0,25 ng/ml y 0,5 ng/ml y el recuento de glóbulos blancos es inferior a 8000 (140), el diagnóstico (154) también es una infección viral. Si los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,25 ng/ml hasta 0,5 ng/ml y hay un recuento de glóbulos blancos mayor a 8000 (142), el diagnóstico (150) es una infección bacteriana. Si los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,5 ng/ml y hay glóbulos blancos (144), el diagnóstico (150) también es de infección bacteriana. Pueden tomarse los antecedentes del paciente, el examen físico, el recuento de glóbulos blancos y otras pruebas de laboratorio (152) para confirmar un diagnóstico clínico final (156).

La Figura 2 muestra un método clínico existente para el diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores. Las pruebas iniciales (160) para el diagnóstico, que incluyen PCR, cultivo y detección de antígenos, son similares a lo descrito con respecto a la Figura 1. Las muestras positivas (162) se identifican con diagnóstico bacteriano o viral.

Para las muestras que son negativas o microbiológicamente no confirmadas (164) con base en la prueba inicial, primero hay una confirmación radiológica/de laboratorio (166), por ejemplo mediante el uso de una radiografía de tórax. Para pacientes con infiltrados focales/lobares (168) identificados en la radiografía de tórax, si los niveles de procalcitonina son al menos 0,25 µg/l o el recuento de glóbulos blancos es al menos 15 000 (170), el diagnóstico (174) es una infección bacteriana. Para los pacientes con infiltrados focales/lobares (168), si los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,25 µg/l y el recuento de glóbulos blancos es inferior a 15 000 (172), el diagnóstico (176) es una infección viral.

Para pacientes con infiltrado difuso/intersticial o sin infiltrado (178) identificado en la radiografía de tórax, si los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,50 µg/l con cualquier valor de recuento de glóbulos blancos (180), el diagnóstico (186) es una infección bacteriana. Si los niveles de procalcitonina en estos pacientes están entre 0,25 µg/l y 0,50 µg/l y el recuento de glóbulos blancos es superior a 12 000 (182), el diagnóstico (186) también es de infección bacteriana. En estos pacientes, si sus niveles de procalcitonina están entre 0,25 µg/l y 0,50 µg/l y el recuento de glóbulos blancos es inferior o igual a 12 000 (184), el diagnóstico (188) es una infección viral. En estos pacientes, si los valores de procalcitonina están entre 0,1 µg/l y 0,25 µg/l y hay glóbulos blancos (190), el diagnóstico (188) también es de infección viral.

En pacientes sin infiltrado (192) detectado en una radiografía de tórax, si los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,1 µg/l (194), el diagnóstico (196) es negativo independientemente del recuento de glóbulos blancos.

Tanto la Figura 1 como la Figura 2 analizan principalmente patógenos específicos o una respuesta inmune general. Estos métodos no diferencian entre colonización e infección activa.

La mejor manera de identificar una respuesta inmune adecuada es de dos maneras. En primer lugar, es poco probable que el crecimiento del cultivo de células bacterianas sin una elevación asociada de procalcitonina o proteína C reactiva represente una infección bacteriana clínicamente significativa y es más probable que represente una colonización. En segundo lugar, los estudios de PCR demostraron repetidamente que tanto el rinovirus como el coronavirus pueden persistir en la nasofaringe sin una respuesta del hospedero y no se relacionan con una infección clínicamente significativa. De manera similar, los pacientes con antecedentes de HSV y CMV pueden tener una eliminación

periódica de ADN que no se asocia con una infección activa. Aunque las pruebas moleculares pueden ser muy útiles para la detección viral, las pruebas moleculares por sí solas no pueden determinar la importancia clínica. Es común que los pacientes no tengan un diagnóstico microbiológico confirmado. Por lo tanto, la confianza en la respuesta del hospedero es fundamental para el tratamiento seguro y efectivo de estos pacientes.

Los métodos descritos en la presente descripción usan MxA para diferenciar entre una infección viral activa y una respuesta no sistémica del hospedero. Después de pruebas moleculares negativas para patógenos virales, los métodos descritos en la presente descripción también usan procalcitonina elevada o proteína C reactiva como diferenciador de la presencia de una probable infección bacteriana.

Un método para diferenciar entre colonización, una respuesta del hospedero no sistémica y una infección activa incluye la etapa de realizar una primera prueba para detectar la presencia de bacterias o virus en una muestra. La primera prueba puede incluir, pero no se limita a, PCR, una prueba radiológica, cultivo viral, IFA viral, prueba de antígeno viral, o un cultivo bacteriano. Si la muestra es positiva para el virus, se realiza una segunda prueba para detectar la presencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA en la muestra (o es positiva para la serología emparejada). En ausencia de 25 ng/ml de MxA o serología emparejada, la muestra se clasifica como sin respuesta sistémica del hospedero. Si la muestra es positiva para al menos 25 ng/ml de MxA, la infección se clasifica como infección viral, independientemente de si existen o no indicios adicionales de una infección bacteriana.

Si la primera prueba es positiva para bacterias, se realiza una segunda prueba para determinar el nivel de procalcitonina o proteína C reactiva en una muestra del paciente. En ausencia de al menos 0,1 ng/ml de procalcitonina o 20 mg/l de proteína C reactiva, en combinación con otros factores, indica colonización bacteriana. Otros niveles de procalcitonina entre 0,10 ng/ml y 0,25 ng/ml, en combinación con otros factores, o proteína C reactiva entre 20 mg/l y 80 mg/l, en combinación con otros factores, también pueden indicar colonización. En otras modalidades, se realizan pruebas solo para bacterias o solo para virus.

En otras modalidades, los niveles de biomarcadores del hospedero (tales como MxA, proteína C reactiva y/o procalcitonina) se determinan inicialmente y, si son negativos en un paciente sintomático, se supone que son clínicamente insignificantes y no son necesarias pruebas adicionales. Sin embargo, si se realizan pruebas adicionales y muestran algún crecimiento o detección de patógenos, esto representaría colonización.

Las bacterias típicas/listadas por IDSA incluyen estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A y C, *Neisseria gonorrhea*, *Arcanobacterium haemolyticum*, y *Fusobacterium necrophorum*. Las bacterias atípicas (no IDSA) incluyen *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*.

La serología emparejada, como se define en la presente descripción, es un aumento del título de anticuerpos específico de un patógeno en un factor de 4 o más entre la muestra de suero de la fase aguda y la de la fase de convalecencia.

La Figura 3 muestra una modalidad de un método para diagnosticar infecciones y colonización de las vías respiratorias superiores mediante el uso de MxA, procalcitonina y/o CRP y otras pruebas de muestras.

La Figura 3 muestra una variedad de pruebas diferentes que pueden realizarse para detectar y diagnosticar una infección de las vías respiratorias superiores (500), por ejemplo, en un ensayo clínico. Sin embargo, en entornos clínicos, normalmente se realizan inicialmente muy pocas de estas pruebas, si es que se realiza alguna. En su lugar, es preferible realizar una prueba rápida, si está disponible, para detectar inicialmente patógenos.

Pueden recogerse muestras nasofaríngeas y orofaríngeas para PCR (501) (ver el lado superior izquierdo de la Figura 3). Si la PCR (502) del virus de Epstein-Barr (EBV) es negativa (503) para IgM de EBV (muestra de suero), el resultado se considera microbiológicamente no confirmado (511). Si la PCR de EBV es positiva (504) para IgM de EBV (muestra de suero), existe confirmación microbiológica (505) de una infección viral.

También pueden realizarse, o alternativamente realizarse, PCR de panel respiratorio, IFA viral o prueba de antígeno viral (506). Un ejemplo de PCR de panel respiratorio que podría realizarse es PCR de panel respiratorio BioFire®, pero podrían usarse sistemas de PCR de panel respiratorio alternativos. Una muestra positiva para influenza A/B, parainfluenza 1-4, Metapneumovirus, Adenovirus, Virus respiratorio sincitial (RSV), Rinovirus o Coronavirus (507), combinada con una serología emparejada positiva o un nivel de MxA superior o igual a 25 ng/ml (590), confirma una infección viral (505). PCR viral positiva (+), cultivo viral, IFA viral o prueba de antígeno viral para Influenza, Parainfluenza 1-4, Metapneumovirus, adenovirus, RSV, Rinovirus o Coronavirus (507) sin serología emparejada positiva o MxA elevada ( $\geq 25$  ng/ml) (595) se clasifica como una respuesta no sistémica del hospedero (509).

Si la muestra es positiva para alguna de las bacterias atípicas *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae* o *Mycoplasma pneumoniae* (512), y los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l (513), el diagnóstico (514) es negativo. Si la muestra es positiva (512) para alguna de estas bacterias atípicas y el nivel de procalcitonina es superior o igual a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva

son superiores o iguales a 20 mg/l o existe serología emparejada (517), se confirma microbiológicamente una infección bacteriana (518).

Si la muestra es negativa para Influenza A/B, Parainfluenza 1-4, Metapneumovirus, Adenovirus, RSV, Rinovirus, Coronavirus, Bordetella, Chlamydia y Mycoplasma (510), la enfermedad se clasifica como microbiológicamente no confirmada (511).

Alternativamente o adicionalmente, pueden tomarse muestras orofaríngeas para cultivo celular (Cx) o PCR (515) (lado superior derecho de la Figura 3). Si la muestra es positiva para estreptococos del grupo A (cultivo celular), estreptococos del grupo C (cultivo celular), Arcanobacterium (cultivo celular) o Fusobacterium (PCR) (516), que son bacterias típicas que se incluyen en la lista IDSA, y los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l o hay serología emparejada positiva (517), hay confirmación microbiológica (518) de una infección bacteriana. Si hay niveles de bacterias que no se incluyen en la lista IDSA de  $10^6$  o superiores en cultivo celular (519) (crecimiento bacteriano mayor que  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU)/ml), y el nivel de procalcitonina es superior o igual a 0,25 ng/ml, los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero menos de 0,25 ng/ml y el recuento de glóbulos blancos es superior a 12 000 o hay bandas presentes, el nivel de proteína C reactiva es superior a 80 mg/l, o la proteína C reactiva es superior o igual a 20 mg/l pero inferior a 80 mg/l y el recuento de glóbulos blancos es superior o igual a 12 000 o hay bandas (520), también hay confirmación microbiológica (518) de infección bacteriana. Si la PCR es positiva para Neisseria (521), se confirma que la infección (518) es bacteriana. Si el cultivo celular es positivo para estreptococos del grupo A o del grupo C (522), los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l (523), hay serología emparejada positiva o al menos 80 % del ULN de anticuerpos contra estreptolisina O (ASO) y un recuento de glóbulos blancos superior o igual a 12 000 (524), se confirma que la infección (518) es bacteriana. Si el cultivo celular es positivo para estreptococo del grupo A o del grupo C (522), los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l (523), hay serología emparejada negativa o menos del 80 % del ULN de anticuerpos contra estreptolisina O (ASO) y el recuento de glóbulos blancos es inferior a 12 000 (529), hay colonización (527) (y la muestra se considera microbiológicamente no confirmada (511)).

Si hay niveles de bacterias que no se incluyen en la lista IDSA de  $10^6$  o mayor en cultivo celular (525) (crecimiento bacteriano mayor que  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU)/ml), y los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,15 ng/ml, los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero inferiores a 0,25 ng/ml y el recuento de glóbulos blancos es inferior a 12 000 y no hay bandas, los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l, o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l pero inferiores a 80 mg/l y el recuento de glóbulos blancos es inferior a 12 000 y no hay bandas (526), hay colonización (527) (y la muestra se considera microbiológicamente no confirmada (511)). Si no hay crecimiento del cultivo celular y la muestra es negativa para PCR (528), la muestra se considera microbiológicamente no confirmada (511). Dado que la PCR es muy sensible, es poco probable que no se detecte un virus o una bacteria atípica. Por lo tanto, cualquier elevación de procalcitonina superior o igual a 0,1 ng/ml es más probable que sea bacteriana.

Todos los resultados microbiológicamente no confirmados (511) pueden analizarse más a fondo (ver la porción inferior de la Figura 3). Solo se realizan análisis adicionales si no hubo confirmación de infección bacteriana o viral. El médico no realiza más análisis si confirmó una infección bacteriana o viral.

Si los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,15 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l en estas muestras (530), el paciente es diagnosticado (531) como negativo. Si los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero inferiores a 0,25 ng/ml en estas muestras, el recuento de glóbulos blancos es inferior a 15 000 y no hay bandas, o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l pero inferiores a 80 mg/l, el recuento de glóbulos blancos es inferior a 15 000 y no hay bandas (532), se diagnostica al paciente (533) una infección viral. Si los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,25 ng/ml, los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero inferiores a 0,25 ng/ml y el recuento de glóbulos blancos es superior o igual a 15 000 o hay bandas presentes, los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 80 mg/l, o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l pero inferiores a 80 mg/l y el recuento de glóbulos blancos es superior a o igual a 15 000 o hay bandas presentes (534), al paciente se le diagnostica (535) una infección bacteriana. El diagnóstico clínico final (536) es negativo, viral o bacteriano.

Tenga en cuenta que, si los niveles de MxA son superiores a 25 ng/ml, el diagnóstico se considera viral independientemente de cuál sea el valor de proteína C reactiva o de procalcitonina. El médico no debe recetar antibióticos y, en cambio, debe adoptar una actitud de espera vigilante, reevaluar más tarde o realizar pruebas de reflejos.

La Figura 4 muestra una modalidad de un método para diagnosticar infecciones de las vías respiratorias inferiores (540) y colonización mediante el uso de MxA, proteína C reactiva, procalcitonina y otros ensayos. La Figura 4 muestra una variedad de pruebas diferentes que pueden realizarse para detectar y diagnosticar una infección de las vías respiratorias inferiores (540), por ejemplo, en un ensayo clínico. Sin embargo, en entornos clínicos, normalmente se

realizan inicialmente muy pocas de estas pruebas, si es que se realiza alguna. En su lugar, es preferible realizar una prueba rápida, si está disponible, para detectar inicialmente patógenos.

Pueden recogerse muestras nasofaríngeas y orofaríngeas para PCR (542) (parte superior izquierda de la Figura 4). Si la PCR del virus de Epstein-Barr (EBV) (581) es negativa (582) para IgM de EBV (muestra de suero), el resultado se considera microbiológicamente no confirmado (565). Si la PCR del EBV es positiva (583) para IgM de EBV (muestra de suero), existe confirmación microbiológica (545) de una infección viral.

También pueden realizarse, o alternativamente realizarse, PCR con panel respiratorio, IFA viral o prueba de antígeno viral (543). Aunque una PCR de panel respiratorio Biofire® se identifica en esta figura, alternativamente podrían usarse otros sistemas de PCR de panel respiratorio. Una muestra positiva para influenza A/B, parainfluenza 1-4, Metapneumovirus, Adenovirus, Virus Respiratorio Sincitial (RSV), Rinovirus o Coronavirus (544), combinada con una serología emparejada positiva o un nivel de MxA superior o igual a 25 ng/ml (597), confirma una infección viral (545). PCR viral positiva (+), cultivo viral, IFA viral o prueba de antígeno viral para Influenza, Parainfluenza 1-4, Metapneumovirus, Adenovirus, RSV, Rinovirus o Coronavirus (544) sin serología emparejada positiva o MxA elevada ( $\geq 25$  ng/ml) (599) se clasifica como una respuesta no sistémica del hospedero (598).

Si la muestra es positiva para Bordetella pertussis, Chlamydia pneumoniae o Mycoplasma pneumoniae (547), y los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l (548), el diagnóstico (549) es negativo. Si la muestra es positiva para alguna de estas bacterias atípicas (547) y el nivel de procalcitonina es superior o igual a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l o existe serología emparejada (551), se confirma microbiológicamente una infección bacteriana (554).

Si la muestra es negativa para Influenza A/B, Parainfluenza 1-4, Metapneumovirus, Adenovirus, RSV, Rinovirus, Coronavirus, Bordetella, Chlamydia y Mycoplasma (546), la enfermedad se clasifica como microbiológicamente no confirmada (565).

Pueden usarse pruebas de antígenos urinarios o PCR (no se muestran en las figuras) para pruebas de Pneumococcus y Legionella de acuerdo con su uso para infecciones de las vías respiratorias inferiores.

Alternativamente o adicionalmente, pueden tomarse muestras orofaríngeas para cultivo celular (Cx) o PCR (552) (lado superior derecho de la Figura 4). Si la muestra es positiva para estreptococos del grupo A (cultivo celular), estreptococos del grupo C (cultivo celular), Arcanobacterium (cultivo celular) o Fusobacterium (PCR) (553), que son bacterias típicas que se incluyen en la lista IDSA, y los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l o hay serología emparejada positiva (551), hay confirmación microbiológica (554) de una infección bacteriana. Si hay niveles de bacterias que no se incluyen en la lista IDSA de  $10^6$  o superiores en cultivo celular (555) (crecimiento bacteriano mayor que  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU)/ml), y el nivel de procalcitonina es superior o igual a 0,25 ng/ml, los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero inferiores a 0,25 ng/ml y el recuento de glóbulos blancos es superior a 12 000 o hay bandas presentes, el nivel de proteína C reactiva es superior a 80 mg/l, o la proteína C reactiva es superior o igual a 20 mg/l pero inferior a 80 mg/l y el recuento de glóbulos blancos es superior o igual a 12 000 o hay bandas (556), también hay confirmación microbiológica (554) de infección bacteriana. Si la PCR es positiva para Neisseria (557), se confirma que la infección (554) es bacteriana. Si el cultivo celular es positivo para estreptococos del grupo A o del grupo C (558), los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l (560), hay serología emparejada positiva o al menos 80 % del ULN de anticuerpos contra estreptolisina O (ASO) y un recuento de glóbulos blancos superior o igual a 12 000 (559), se confirma que la infección (554) es bacteriana. Si el cultivo celular es positivo para estreptococo del grupo A o del grupo C (559), los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,1 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l (560), hay serología emparejada negativa o menos del 80 % del ULN de anticuerpos contra estreptolisina O (ASO) y el recuento de glóbulos blancos es inferior a 12 000 (561), hay colonización (562) (y la muestra se considera microbiológicamente no confirmada (565)).

Si hay niveles de bacterias que no se incluyen en la lista IDSA de  $10^6$  o superiores en cultivo celular (563) (crecimiento bacteriano mayor que  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU)/ml), y los niveles de procalcitonina son inferiores a 0,15 ng/ml, los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero inferiores a 0,25 ng/ml y el recuento de glóbulos blancos es inferior a 12 000 y no hay bandas, los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l, o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l pero inferiores a 80 mg/l y el recuento de glóbulos blancos es inferior a 12 000 y no hay bandas (564), hay colonización (562) (y la muestra se considera microbiológicamente no confirmada (565)). Si no hay crecimiento del cultivo celular y la muestra es negativa para la PCR (566), la muestra se considera microbiológicamente no confirmada (565). Dado que la PCR es muy sensible, es poco probable que no se detecte un virus o una bacteria atípica; por lo tanto, cualquier elevación de procalcitonina superior o igual a 0,1 ng/ml es más probable que sea bacteriana.

Los pacientes con resultados microbiológicamente no confirmados (565) pueden someterse a una radiografía de tórax (571) para determinar si se identifica un infiltrado. Solo se realizan análisis adicionales si no hubo confirmación de infección bacteriana o viral. El médico no realiza más análisis si confirmó una infección bacteriana o viral.

Si se identifica un infiltrado (572), y los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero inferiores a 0,25 ng/ml en estas muestras, el recuento de glóbulos blancos es inferior a 15 000 y no hay bandas, o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l pero inferiores a 80 mg/l, el recuento de glóbulos blancos es inferior a 15 000 y no hay bandas (575), el paciente es diagnosticado (576) con una infección viral. Si los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,25 ng/ml, los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero inferiores a 0,25 ng/ml y el recuento de glóbulos blancos es superior o igual a 15 000 o hay bandas presentes, los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 80 mg/l, o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l pero inferiores a 80 mg/l y el recuento de glóbulos blancos es superior a o igual a 15 000 o hay bandas presentes (573), se diagnostica al paciente (574) con una infección bacteriana. Si los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero inferiores a 0,25 ng/ml en estas muestras, el recuento de glóbulos blancos es inferior a 15 000 y no hay bandas, o los niveles de proteína C reactiva son superiores a o iguales a 20 mg/l pero inferiores a 80 mg/l, el recuento de glóbulos blancos es inferior a 15 000 y no hay bandas (575), se diagnostica al paciente (576) con una infección viral.

Si no se identifica ningún infiltrado (577), y los niveles de procalcitonina son superiores o iguales a 0,15 ng/ml pero inferiores a 0,25 ng/ml en estas muestras, el recuento de glóbulos blancos es inferior a 15 000 y no hay bandas, o los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l pero inferiores a 80 mg/l, el recuento de glóbulos blancos es inferior a 15 000 y no hay bandas (575), el paciente se diagnostica (576) con una infección viral. Si el nivel de procalcitonina es inferior a 0,15 ng/ml o los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l (578), la enfermedad se clasifica como negativa (579). El diagnóstico clínico final (580) es negativo, viral o bacteriano.

Tenga en cuenta que, si los niveles de MxA son superiores a 25 ng/ml, el diagnóstico se considera viral independientemente de cuál sea el valor de proteína C reactiva o de procalcitonina. El médico no debe recetar antibióticos y, en cambio, debe adoptar una actitud de espera vigilante, reevaluar más tarde o realizar pruebas de reflejos.

Aunque las Figuras 3 y 4 muestran modalidades para diagnosticar infecciones respiratorias, los valores de MxA, proteína C reactiva y procalcitonina en las figuras podrían usarse alternativamente para diagnosticar otros tipos de infecciones bacterianas y virales (por ejemplo, infecciones gástricas, meningitis, encefalitis, celulitis, infecciones de las vías urinarias, otitis y conjuntivitis), así como también para identificar colonizaciones.

En un ejemplo, cualquiera de los dispositivos mostrados en las Figuras 13, 15 o 17 podría usarse para diferenciar una infección activa de la colonización de un virus o bacteria. Una prueba de detección directa de antígenos, tal como la prueba de estreptococos o cualquier PCR, no puede diferenciar la colonización de la infección activa. Solo una prueba que detecte la respuesta inmune del hospedero, tal como los biomarcadores del origen del hospedero, puede lograr tal diferenciación. Los análisis de MxA y proteína C reactiva (o PCT) permiten al usuario obtener datos de detección de infecciones bacterianas y virales, lo que aumenta la capacidad de determinar la colonización.

No se necesita tratamiento para la colonización. Este tipo de "infección localizada" desaparece por sí sola sin convertirse en una infección activa.

Las Figuras 18 y 19 usan la proteína C reactiva para diagnosticar una infección respiratoria en pacientes microbiológicamente no confirmados. La Figura 18 muestra métodos de diagnóstico para pacientes con sospecha de infección de las vías respiratorias superiores. Si las pruebas microbiológicas, tales como PCR, cultivo o detección de antígenos (900), son positivas (902) para bacterias o virus, se diagnostica (918), (920) al paciente una infección bacteriana o viral. Si las pruebas de confirmación microbiológica (por ejemplo, PCR, cultivo y/o detección de antígenos) son negativas (904), se realiza una confirmación de laboratorio adicional (906). Si el paciente tiene valores de proteína C reactiva superiores o iguales a 60 mg/l y cualquier valor de glóbulos blancos (908), se diagnostica al paciente (918) con una infección bacteriana. Si el paciente tiene un valor de proteína C reactiva de 20 mg/l < CRP < 60mg/l y un recuento de glóbulos blancos superior o igual a 10 000 (910), también se diagnostican (918) con una infección bacteriana. Si el paciente tiene un valor de proteína C reactiva de 20 mg/l < CRP < 60mg/l y un recuento de glóbulos blancos inferior a 10 000 (912), el paciente se diagnostica (920) con una infección viral. Si el paciente tiene un valor de proteína C reactiva de 10 mg/l < CRP < 20mg/l y cualquier valor de glóbulos blancos (914), el paciente también se diagnostica (920) con una infección viral. Si el paciente tiene un valor de proteína C reactiva inferior a 10 mg/l y un recuento de glóbulos blancos inferior a 10 000 (916), se diagnostica (922) que el paciente es negativo para infección. Los recuentos de glóbulos blancos son menos del 50 % específicos y no pueden diferenciar una infección viral o bacteriana. La elevación del recuento de glóbulos blancos no es diagnóstico de una infección clínicamente significativa.

La Figura 19 muestra métodos de diagnóstico para pacientes con sospecha de infección de las vías respiratorias inferiores. Si las pruebas microbiológicas, tales como PCR, cultivo o detección de antígenos (925), son positivas (926) para bacterias o virus, se diagnostica al paciente una infección bacteriana o viral. En presencia de una respuesta inmune sistémica, cualquier PCR se considera positiva o si el paciente tiene una neumonía confirmada radiológicamente. Si las pruebas de confirmación microbiológica (por ejemplo, PCR, cultivo y/o detección de antígenos) son negativas (928), se realiza una confirmación radiológica o de laboratorio adicional (930). La presencia de evidencia radiológica de infiltrados difusos en la radiografía de tórax sugiere una infección viral, mientras que la presencia de evidencia radiológica de un proceso lobar focal o infiltrado en la radiografía de tórax sugiere una infección

bacteriana. Si el paciente tiene un infiltrado focal/lobular (932) y los niveles de proteína C reactiva son superiores o iguales a 20 mg/l o el recuento de glóbulos blancos es superior o igual a 10 000 (934), se diagnostica al paciente (938) con una infección bacteriana. Si el paciente tiene un infiltrado focal/lobular (932) y los niveles de proteína C reactiva son inferiores a 20 mg/l y el recuento de glóbulos blancos es inferior a 10 000 (936), se diagnostica al paciente (940) con una infección viral. Si un paciente tiene niveles de proteína C reactiva inferiores a 20 mg/l y un recuento de glóbulos blancos superior a 10 000 (no se muestra), es posible que tenga afecciones no infecciosas como asma o exacerbación de la COPD. Si el paciente tiene infiltrado difuso/intersticial o ningún infiltrado (948), un nivel de proteína C reactiva superior o igual a 60 mg/l y cualquier valor de glóbulos blancos (942), se diagnostica al paciente (944) con una infección bacteriana. Si el paciente tiene infiltrado difuso/intersticial o no tiene infiltrados (948), un nivel de proteína C reactiva de 20 mg/l < CRP < 60mg/l y un recuento de glóbulos blancos superior o igual a 10 000 (946), el paciente también se diagnostica (944) con una infección bacteriana. Si el paciente tiene infiltrado difuso/intersticial o no tiene infiltrados (948), un nivel de proteína C reactiva de 20 mg/l < CRP < 60mg/l y un recuento de glóbulos blancos inferior a 10 000 (950), el paciente se diagnostica (954) con una infección viral. Si el paciente tiene infiltrado difuso/intersticial o no tiene infiltrados (948), un nivel de proteína C reactiva de 10 mg/l < CRP < 20mg/l y cualquier recuento de glóbulos blancos (952), el paciente también se diagnostica (954) con una infección viral. Si el paciente no tiene infiltrado (956), un valor de proteína C reactiva inferior a 10 mg/l y un recuento de WBC inferior a 10 000 (958), se diagnostica al paciente como negativo (960) para infección y el resultado puede indicar colonización.

Los métodos de las Figuras 18 y 19 podrían usarse en combinación con la determinación de los niveles de MxA, para diagnosticar mejor a los pacientes con una infección viral o bacteriana, colonización o una enfermedad microbiológicamente no confirmada.

Los solicitantes señalan que descubrieron que la coinfección es muy inusual. Muchos estudios revisados por pares no diferenciaron la colonización de la infección, por lo que todas las personas colonizadas parecerían tener una pseudocoinfección. En realidad, esto es falso porque el uso de proteína C reactiva sola a 20 mg/ml para determinar el tratamiento no provocó un aumento de la morbilidad a pesar de no tratar a muchos pacientes con cultivos positivos.

Durante un ensayo clínico multicéntrico prospectivo con tira reactiva dual, se confirmó la presencia de rinovirus mediante PCR en 52 sujetos; sin embargo, solo 8/52 pacientes demostraron realmente una elevación en MxA. De aquellos pacientes con rinovirus confirmado y MxA elevada, la tira reactiva dual del solicitante identificó correctamente a 5/8. Debido a que el rinovirus no se incluye en el uso previsto y 8 pacientes tenían una MxA elevada, estos pacientes se consideraron "falsos positivos", a pesar de ser correctos, lo que condujo a una especificidad viral artificialmente menor. No se detectó colonización de patógenos virales o bacterianos ni eliminación viral periódica sin una respuesta sistémica invasiva. Se requirió la presencia de un recuento elevado de procalcitonina y/o glóbulos blancos en asociación con patógenos conocidos para diferenciar la colonización bacteriana de la infección activa. Dado que los rinovirus y los coronavirus son colonizadores frecuentes de las vías respiratorias y solo causan una infección activa clínicamente significativa en aproximadamente el 10 % de los pacientes, estos dos virus no se incluyeron en el uso previsto.

El nuevo método puede diferenciar el virus colonizador de la infección invasiva activa de varias maneras. En una modalidad, el método se usa para detectar solo Influenza A/B, Metapneumovirus, Adenovirus, RSV, virus de Parainfluenza y virus de Epstein-Barr, lo que excluye Rinovirus, Coronavirus, HSV y CMV. En otra modalidad, para diferenciar la infección verdadera de la colonización o diseminación latente, virus del herpes simple, Citomegalovirus, Rinovirus y Coronavirus se considerarán verdaderos positivos si son positivos por PCR y se asocian con un nivel de procalcitonina normal y MxA elevada  $\geq 25$  ng/ ml. En otra modalidad más, si Epstein-Barr, HSV o CMV es positivo mediante PCR, la presencia de una prueba de sangre de IgM positiva simultánea confirmaría un verdadero positivo. El riesgo es que se necesitan 5-7 días para que se desarrolle un anticuerpo IgM. Esta modalidad no es aplicable a Rinovirus o CMV. En esta modalidad, una PCR viral (EBV, HSV o CMV) positiva y una prueba de IgG de VCA (antígeno de la cápsida viral) positiva (EBV, HSV o CMV) indican una nueva infección viral. Una PCR viral (EBV, HSV o CMV) positiva y una prueba de IgG de VCA negativa (EBV, HSV o CMV) indican que no hay infección aguda. Una PCR viral (EBV, HSV o CMV) negativa y una prueba de IgG de VCA positiva (EBV, HSV o CMV) indican un falso positivo.

Los protocolos actuales conducen a un diagnóstico excesivo de infección bacteriana, al uso inadecuado de antibióticos y a una desviación de las recomendaciones actuales sobre administración de antibióticos. Estudios de resultados de 14 ensayos clínicos aleatorios Muller, F y otros, Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with community-acquired pneumonia: a prospective cohort trial. Chest 2010, 138:121-129; van Nieuwkoop, C. y otros, Procalcitonin reflects bacteremia and bacterial load in urosepsis syndrome: a prospective observational study. Crit Care 2010, 14:R206; Riedel, S y otros, Procalcitonin as a marker for the detection of bacteremia and sepsis in the emergency department. Am J Clin Pathol 2011, 135:182-189; Schuetz, P. y otros, Serum procalcitonin for discrimination of blood contamination from bloodstream infection due to coagulase- negative staphylococci. Infection 2007, 35:352-355; Christ-Crain, M. y otros, Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster- randomised, single-blinded intervention trial. Lancet 2004, 363:600-607; Schuetz, P. y otros, ProHOSP Study Group: Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections: the ProHOSP randomized controlled trial. JAMA 2009, 302:1059-1066; Stolz, D. y otros, Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy. Chest 2007, 131:9-19; Christ-Crain M., Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-

acquired pneumonia: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 174:84-93; Kristoffersen, KB y otros, Antibiotic treatment interruption of suspected lower respiratory tract infections based on a single procalcitonin measurement at hospital admission-a randomized trial. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15:481-487; Long, W. y otros, [The value of serum procalcitonin in treatment of community acquired pneumonia in outpatient]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2009, 48:216-219; Long, W. y otros, Procalcitonin-guidance for reduction of antibiotic use in low-risk outpatients with community acquired pneumonia. *Respirology* 2011, 16:819-824; Burkhardt, O. y otros, Procalcitonin guidance and reduction of antibiotic use in acute respiratory tract infection. *Eur Respir J* 2010, 36:601-607; Elsammak y otros, Diagnostic value of serum procalcitonin and C-reactive protein in Egyptian children with streptococcal tonsillopharyngitis. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:174-6; Bouadma, L. y otros, M, PRORATA trial group: Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2010, 375:463-474; Stolz, D. y otros, Procalcitonin for reduced antibiotic exposure in ventilator-associated pneumonia: a randomised study. *Eur Respir J* 2009, 34:1364-1375; Briel, M. y otros, Procalcitonin-guided antibiotic use vs a standard approach for acute respiratory tract infections in primary care. *Archives Intern Med.* 2008;168:2000-7), así como también el borrador de las directrices del NICE para el uso de la proteína C reactiva, lo respaldan.

Los protocolos de la técnica anterior, que usaban los valores de corte recomendados de 0,15 ng/ml para la procalcitonina y no analizaban los niveles de MxA, categorizaron erróneamente a dos pacientes en uno de nuestros estudios con estreptococo del grupo C y procalcitonina elevada como viral y a dos pacientes adicionales sin confirmación bacteriana microbiológica como viral.

Los nuevos métodos descritos en la presente descripción usan procalcitonina o proteína C reactiva para diferenciar la colonización de una verdadera infección bacteriana. Los nuevos métodos también usan MxA para diferenciar entre una infección viral y ninguna respuesta sistémica del hospedero.

Las pruebas de proteína C reactiva y MxA miden una respuesta inmunitaria clínicamente significativa ante una sospecha de infección viral y/o bacteriana invasiva en pacientes mayores de 1 año que se presentan dentro de los 3 días posteriores a una fiebre de inicio agudo y dentro de los 7 días posteriores a la aparición de síntomas respiratorios consistentes con una sospecha de infección de las vías respiratorias superiores adquirida en la comunidad (rinofaringitis, faringoamigdalitis, laringotraqueítis) o infección de las vías respiratorias inferiores (traqueobronquitis, bronquiolitis o neumonía). Estas pruebas ayudan a identificar 1) pacientes con una infección viral invasiva subyacente por Influenza A/B, Adenovirus, Virus respiratorio sincitial, Metapneumovirus, virus de Parainfluenza o virus de Epstein-Barr; 2) pacientes con una respuesta elevada del hospedero clínicamente significativa consistente con una infección bacteriana subyacente. Las pruebas de MxA y proteína C reactiva pueden resultar en una infección viral positiva (si el nivel de MxA crea un resultado positivo de MxA), una infección bacteriana positiva (si los niveles de proteína C reactiva crean resultados positivos de proteína C reactiva), o coinfección (si tanto los niveles de MxA como de proteína C reactiva son positivos). Si bien la coinfección es más probable con este ensayo, los estudios del solicitante no confirmaron ningún paciente con coinfección. Si son negativos, dan lugar a una enfermedad respiratoria no confirmada microbiológicamente. Más abajo se describen con más detalle algunos ejemplos de tiras reactivas que usan niveles de proteína C reactiva y MxA para diagnosticar infecciones.

Pruebas adicionales pueden confirmar que el resultado negativo es realmente negativo para infección. Algunos ejemplos de formas de confirmar que un paciente con una enfermedad respiratoria es negativo para infección, en adición a realizarle pruebas de MxA, proteína C reactiva y/o procalcitonina, incluyen un panel respiratorio de PCR negativo (por ejemplo, un panel respiratorio BioFire™, Biofire Diagnostics, Inc., Salt Lake City, Utah), cultivos de esputo, sangre o garganta negativos, pruebas de PCR viral adicionales negativas, pruebas de antígenos en orina negativas o una radiografía de tórax negativa.

Si los pacientes sin confirmación microbiológica tienen uno o más de estos resultados negativos, se presume que no son infecciosos. Estos pacientes no infecciosos pueden tener, por ejemplo, alergia, fiebre medicamentosa, cáncer, enfermedad del tejido conectivo, enfermedad de la tiroides, gota, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis, vacunación o coágulos sanguíneos. Como se describe más abajo, pueden realizarse pruebas adicionales para intentar confirmar microbiológicamente la etiología de su enfermedad.

#### Diagnósticos microbiológicamente no confirmados (MU)

Como comentario general, el solicitante observó en sus ensayos más casos microbiológicamente no confirmados de los esperados. Esto se debió en parte al momento estacional (el primer ensayo se realizó en invierno y el segundo en primavera y verano), pero los resultados fueron similares a los informes de la literatura. Con base en una extensa revisión de la literatura, una prevalencia promedio estimada de enfermedades microbiológicamente no confirmadas (MU) es del 50 %.

Las enfermedades microbiológicamente no confirmadas pueden deberse a un verdadero negativo, a una colonización o a una enfermedad microbiológicamente no confirmada (MU) que podría ser una enfermedad emergente no identificada previamente.



casos En algunas modalidades, cuando la causa de la enfermedad de un paciente aún no se confirmó microbiológicamente después de la prueba, se toman etapas adicionales para intentar determinar un diagnóstico. Una etapa adicional es tomar una segunda muestra del paciente y volver a analizar uno o más de los mismos biomarcadores analizados en la primera muestra. La segunda muestra se toma, preferentemente, entre cuatro y setenta y dos horas después de la primera muestra. En algunas modalidades preferidas, la segunda muestra se toma dentro de las veinticuatro horas posteriores a la toma de la primera muestra. En otras modalidades preferidas, la segunda muestra se toma entre cuatro y doce horas después de que se tome la primera muestra. En otras modalidades preferidas, la segunda muestra se toma entre seis y ocho horas después de que se tome la primera muestra.

En algunas modalidades preferidas, se toma otra muestra del paciente dentro de cuatro a setenta y dos horas después de que se tomó la muestra inicial para analizar MxA, proteína C reactiva y/o procalcitonina, y se analiza por segunda vez para detectar la presencia de MxA elevada, proteína C reactiva y/o procalcitonina.

En algunas modalidades, la segunda prueba es, preferentemente, una prueba cuantitativa, para determinar si los niveles de uno o más de estos biomarcadores aumentaron. En algunas de estas modalidades, la segunda muestra se analiza para determinar MxA dentro de cuatro a ocho horas de la prueba inicial. En otras modalidades, se realizan investigaciones y pruebas adicionales para tratar de determinar si un paciente con un diagnóstico microbiológicamente no confirmado tiene una enfermedad o dolencia emergente.

Con respecto a las Figuras 3-4 y 18-20, los pacientes que finalmente se diagnostican como negativos en esos métodos se consideran aún microbiológicamente no confirmados.

Los dispositivos de las Figuras 13 y 15 proporcionan una prueba rápida que puede diferenciar una infección activa de una enfermedad respiratoria u otro tipo de enfermedad de etiología viral o bacteriana. La procalcitonina y la proteína C reactiva por sí solas no pueden hacerlo. No se necesita tratamiento para enfermedades microbiológicamente no confirmadas. Sin embargo, realizar pruebas adicionales de MxA y proteína C reactiva (o procalcitonina) en un período de tiempo más corto, tal como tomar una segunda muestra de cuatro a setenta y dos horas después de la primera muestra y analizarla para detectar la presencia de estos biomarcadores, puede ser prudente para descartar el efecto pródromo. Alternativamente, pruebas adicionales para MxA, proteína C reactiva y/o procalcitonina, solas o en combinación, con una segunda muestra tomada de cuatro a setenta y dos horas después de la primera muestra usada para identificar la presencia de estos biomarcadores podrían identificar mejor la etiología de la enfermedad del paciente. Esta segunda prueba también descarta el efecto pródromo.

La segunda muestra para analizar MxA, proteína C reactiva y/o procalcitonina se toma, preferentemente, entre cuatro y setenta y dos horas después de la primera muestra. En algunas modalidades preferidas, la segunda muestra se toma dentro de las veinticuatro horas posteriores a la toma de la primera muestra. En otras modalidades preferidas, la segunda muestra se toma entre cuatro y doce horas después de que se tome la primera muestra. En otras modalidades preferidas, la segunda muestra se toma entre seis y ocho horas después de que se tome la primera muestra.

Por ejemplo, si una muestra analizada mediante el uso del dispositivo de las Figuras 13, 15 o 17 tiene los resultados mostrados en la Figura 14A, podría tomarse una segunda muestra de ese paciente y la segunda muestra podría analizarse en el dispositivo de las Figuras 13, 15 o 17 nuevamente para MxA, CRP baja y CRP alta. Si ese paciente tiene una infección viral o bacteriana, la segunda muestra indicaría un resultado positivo para MxA o proteína C reactiva, respectivamente.

Como otro ejemplo, si una muestra analizada para proteína C reactiva y MxA mediante el uso del dispositivo de la Figura 9 u otros métodos de ensayo conocidos en la técnica es negativa tanto para proteína C reactiva como para MxA, podría tomarse una segunda muestra de ese paciente y la segunda muestra podría analizarse nuevamente en el dispositivo de la Figura 9 para determinar MxA y proteína C reactiva. Si ese paciente tiene una infección viral o bacteriana, la segunda muestra indicaría un resultado positivo para MxA o proteína C reactiva, respectivamente.

Como tercer ejemplo, podría analizarse una muestra para determinar procalcitonina y MxA mediante el uso de dispositivos conocidos en la técnica. Si la muestra es inicialmente negativa tanto para MxA como para procalcitonina, podría tomarse una segunda muestra de ese paciente y la segunda muestra podría analizarse nuevamente para MxA y procalcitonina. Si ese paciente tiene una infección viral o bacteriana, la segunda muestra indicaría un resultado positivo para MxA o procalcitonina, respectivamente.

Los resultados de la segunda prueba en cualquiera de estos ejemplos guiarían al médico en sus decisiones sobre si prescribir antibióticos. Esta guía se proporcionaría mucho antes que en el sistema de diagnóstico de la técnica anterior, que se basaba en un enfoque de "esperar y ver", y esperaría al menos 48 horas para ver si el paciente empeoraba antes de realizar cualquier prueba adicional.

Estudios de diagnóstico mediante el uso de marcadores de respuesta inmune

El solicitante realizó ensayos clínicos prospectivos, multicéntricos y enmascarados para identificar una respuesta inmune a una infección viral y/o bacteriana relacionada con una infección respiratoria febril aguda adquirida en la comunidad. El estudio se realizó en sujetos mayores de 1 año de edad que acudieron a consultorios ambulatorios de atención primaria y de atención de urgencia y a departamentos de emergencia en sitios de ensayos clínicos geográficamente diversos en los Estados Unidos.

Mediante el uso de una combinación de pruebas de Procalcitonina (dispositivo Vidas® de bioMérieux) y pruebas ELISA de proteína A de resistencia a mixovirus (MxA), los datos respaldan la exactitud de combinar estos marcadores ya sea de manera cuantitativa o cualitativa en cualquier tipo de dispositivo, que incluyen, pero no se limitan a, dispositivos de flujo lateral, quimioluminiscencia, perlas, ELISA de fluorescencia, sistemas automatizados de prueba de inmunoensayo/inmunoanálisis (por ejemplo, sistemas de inmunoensayo Vidas® o miniVidas® de BioMérieux).

Las figuras 5A-5L muestran los resultados de 148 pacientes en el ensayo. Cada hilera identifica a un paciente diferente en el ensayo. La columna uno identifica a cada paciente con un número arbitrario. La columna dos muestra los niveles cuantitativos de procalcitonina venosa (ng/ml) y la columna tres muestra los niveles cuantitativos de ELISA de MxA. La columna cuatro enumera el organismo/infección, si corresponde, que se detectó por un cultivo de garganta. La columna cinco enumera el diagnóstico clínico dado a ese paciente. La columna seis proporciona una descripción y comentarios sobre cómo se llegó al diagnóstico. Para los diagnósticos negativos que no incluyen valores de MxA, no se realizó el ensayo de MxA.

La infección bacteriana se definió y diagnosticó en el ensayo de la siguiente manera:

- Se realizó hisopado de orofaringe y cultivos bacterianos.
- Dado que la procalcitonina puede encontrarse en el suero de una persona sana ( $< 0,11$  ng/ml) y los ensayos actuales demuestran una precisión entre ensayos de aproximadamente el 10 % (Aouifi y otros, Crit care Med. 2000, 28:3171-6), el límite del protocolo anterior para la infección bacteriana definitiva se redujo de 0,5 ng/ml a un nuevo límite inferior de 0,15 ng/ml.
- Cualquier cultivo con bacterias cultivadas  $> 10^6$  CFU y asociado con una procalcitonina elevada superior o igual a 0,15 ng/ml se consideró una verdadera infección bacteriana.
- Cualquier cultivo con una sola especie de bacteria patógena primaria (tal como el estreptococo del grupo A o del grupo B para infecciones de las vías respiratorias superiores) y asociado con una procalcitonina elevada superior o igual a 0,1 ng/ml se consideró positivo para una infección bacteriana verdadera, incluso si el crecimiento bacteriano es inferior a  $> 10^6$  CFU siempre y cuando el paciente tenga una PCR negativa para un patógeno viral.
- En los pacientes que dieron negativo en cualquier prueba microbiológica y tenían una procalcitonina elevada  $\geq 0,15$  ng/ml también se consideró que tenían una infección bacteriana.

La infección viral se definió y diagnosticó en el ensayo de la siguiente manera:

- Se envió un hisopo orofaríngeo y nasofaríngeo para análisis de reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de la prueba de panel respiratorio BioFire™ (Biofire Diagnostics, Inc., Salt Lake City, Utah).
- Para diferenciar la infección verdadera de la colonización o diseminación latente, virus del herpes simple, Citomegalovirus, Rinovirus y Coronavirus se considerarán verdaderos positivos si se asocian con un nivel normal de procalcitonina y MxA elevada  $\geq 20$  ng/ml.

La prueba combinada identificó con exactitud 83 de 84 infecciones respiratorias microbiológicamente no confirmadas (MU), 26 de 35 infecciones virales y 29 de 29 infecciones bacterianas.

La prueba combinada reduce la cantidad de prescripciones innecesarias de antibióticos debido a su capacidad para diferenciar entre infección viral y bacteriana.

La Figura 6 muestra las bacterias identificadas en un ensayo. La Figura 7 muestra las bacterias identificadas mediante el uso del nuevo método descrito en la presente descripción. En la Figura 6, todas las bacterias identificadas en el ensayo se consideran una infección bacteriana y no se consideran colonización. En la Figura 7, los pacientes con infección bacteriana positiva cambian porque solo se cuentan las infecciones verdaderas.

Uso de dispositivos de flujo lateral en combinación con un dispositivo para determinar los niveles de procalcitonina

En algunas modalidades en las que se detecta procalcitonina en combinación con MxA y uno o dos niveles de proteína C reactiva, se usan dispositivos de flujo lateral para detectar MxA y/o proteína C reactiva y se usan otros dispositivos de ensayo para detectar procalcitonina. Los dispositivos de flujo lateral son conocidos y se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. núm. 7,723,124 y la publicación de patente de EE. UU. núm. y 2007/0059682. Alternativamente podrían usarse otros dispositivos de flujo lateral conocidos en la técnica con los sistemas y métodos de la presente invención.

Cualquiera de los dispositivos y métodos descritos en la publicación de patente de EE. UU. 2010/0297611, publicada el 25 de noviembre de 2010, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections", publicación de patente de EE. UU. 2013/0196310, publicada el 1 de agosto de 2013, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections", patente de EE. UU. núm. 8,962,260, publicada el 24 de febrero de 2015, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections", y publicación de patente de EE. UU. 2013/0130367, publicada el 23 de mayo de 2013, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections" podría usarse en los métodos y dispositivos descritos en la presente descripción para detectar niveles de MxA y/o proteína C reactiva.

La solicitud de patente publicada en EE. UU. núm. 2007/0059682, describe la detección de un analito y una muestra que también pueden contener una o más sustancias interferentes. Esta publicación enseña cómo separar el analito de las sustancias que interfieren mediante la captura de las sustancias que interfieren en el soporte cromatográfico y la detección del analito en el soporte separado de las sustancias interferentes.

La patente de EE. UU. núm. 7,723,124, expedida el 25 de mayo de 2010, describe un método para detectar objetivos, tales como patógenos y/o componentes asociados a alergias, en un fluido corporal humano donde la muestra de fluido corporal se recoge mediante un dispositivo de recogida, tal como un hisopo. Las muestras se transfieren desde el elemento de hisopo a un dispositivo de análisis de muestras, en el que puede realizarse un análisis de los objetivos por medios inmunoquímicos o enzimáticos. El resultado de la prueba puede mostrarse en un período de tiempo muy corto y el usuario puede leerlo directamente. Esto permite realizar pruebas en el punto de atención con resultados disponibles durante la visita del paciente.

En la Figura 8 se muestra un ejemplo de una prueba de detección rápida para distinguir una infección viral de una bacteriana. Como se mencionó anteriormente, MxA es un marcador de diagnóstico de infección viral, mientras que la proteína C reactiva es un marcador de diagnóstico de infección bacteriana. En este ejemplo, una línea azul ("línea de control" en A-D de la Figura) representa el control. Una línea verde representa un nivel de proteína C reactiva (CRP) > 15 mg/l ("prueba de CRP" en A-D de la figura). Una línea roja representa un nivel de MxA > 20 ng/ml ("prueba de MxA" en A-D de la figura). Un resultado positivo para la proteína MxA, con un resultado negativo para la proteína CRP indica solo una infección viral (resultado de la prueba visual A). Un resultado positivo para la (CRP) con un resultado negativo para la proteína MxA indica solo una infección bacteriana (resultado de la prueba visual B). Un resultado positivo tanto para MxA como para la proteína C reactiva indica coinfección (infección tanto por una bacteria como por un virus) (resultado de la prueba visual C). No se indica ninguna infección bacteriana o viral mediante un resultado negativo tanto para MxA como para la proteína C reactiva (resultado de la prueba visual D). Si bien en este ejemplo se analizan líneas de colores particulares, otros colores, o los mismos colores en diferentes ubicaciones de la tira reactiva para indicar marcadores virales o bacterianos, están dentro del espíritu de la presente invención.

Cuando se utiliza el desarrollo de líneas de diferentes colores, las líneas pueden separarse físicamente o no por un espacio. En el último caso, las etiquetas se eligen de manera que el color que se ve cuando ambos marcadores están presentes sea diferente de los colores que se ven cuando los marcadores individuales están presentes. Por ejemplo, la presencia del marcador viral puede indicarse mediante una línea roja; la presencia del marcador bacteriano mediante una línea azul; y la presencia de ambos por una línea violeta (rojo y azul combinados).

La tira reactiva también puede incluir una sección de control que indica la funcionalidad de la tira reactiva. La Figura 8 muestra una línea de control. Si está presente, la sección de control puede diseñarse para transmitir una señal al usuario de que el dispositivo funcionó. Por ejemplo, la sección de control puede contener un reactivo (por ejemplo, un anticuerpo) que se unirá a los reactivos marcados de la zona de reactivos. En una modalidad preferida, se usa antipolvo de conejo como línea de control e IgY de pollo conjugada con un marcador, por ejemplo perlas de látex azul, es el conjugado de control. Alternativamente, la sección de control puede contener un reactivo anhidro que, cuando se humedece, produce un cambio de color o formación de color, por ejemplo, sulfato de cobre anhidro que se volverá azul cuando se humedezca con una muestra acuosa. Como alternativa adicional, la sección de control podría contener marcadores virales y bacterianos inmovilizados que reaccionarán con el exceso de reactivo marcado de la zona de reactivo. La sección de control puede situarse aguas arriba o aguas abajo de la zona de detección. Un indicador de control positivo le indica al usuario que la muestra permeó la distancia requerida a través del dispositivo de prueba.

Las Figuras 9A y 9B muestran una tira de prueba cromatográfica (400) con una línea de prueba (402) correspondiente a la presencia de un marcador viral como MxA y una segunda línea de prueba separada (403) que detecta la presencia de un marcador bacteriano tal como proteína C reactiva o procalcitonina. La muestra se aplica a la zona de aplicación (401) de la tira de prueba cromatográfica (400). Como se muestra en la Figura 9A, la muestra después pasa por una zona de reactivo (460) que contiene al menos un compañero de unión viral marcado y al menos un compañero de unión bacteriano marcado que se eluye y después puede migrar con un líquido de transporte de muestra (por ejemplo, una solución tampón). Alternativamente, como se muestra en la Figura 9B, la zona de reactivo (460) se ubica aguas arriba de la zona de aplicación de muestra (401) de manera que los compañeros de unión etiquetados en la zona de reactivo se eluyen por el líquido de transporte de muestra y viajan a la muestra. El compañero de unión viral marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador viral de interés para formar un complejo que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo o compañero de unión específico en la zona de detección. El compañero de unión bacteriano marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador bacteriano de interés para formar un

complejo que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo o compañero de unión específico en la zona de detección. Aunque no se muestran en estas figuras, una almohadilla absorbente, así como también otros componentes conocidos de inmunoensayo de flujo lateral que incluyen, pero no se limitan a, una zona de desechos, un respaldo de soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para la lectura de resultados, pueden opcionalmente también ser un componente de la tira reactiva (400) en estas modalidades.

La tira reactiva (400) también incluye una zona de detección (405) que contiene al menos una primera sección para la detección de un marcador viral, por ejemplo, una línea de prueba (402), que incluye un compañero de unión específica inmovilizado, complementario al complejo reactivo viral formado por el marcador viral y su compañero de unión marcado. Por lo tanto, en la línea de prueba (402), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan a los compañeros de unión virales marcados de la zona de reactivos (460) junto con sus marcadores virales unidos. Esta localización del marcador viral con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (402). En la línea de prueba (402), la presencia del marcador viral se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (402) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados.

La zona de detección (405) también incluye al menos una segunda sección para la detección de un marcador bacteriano, por ejemplo, una línea de prueba (403), que incluye un compañero de unión específica inmovilizado, complementario al complejo reactivo bacteriano formado por el marcador bacteriano y su compañero de unión marcado. Por lo tanto, en la línea de prueba (403), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan los compañeros de unión bacterianos marcados de la zona de reactivos (460) junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización del marcador bacteriano con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (403). En la línea de prueba (403), la presencia del marcador bacteriano se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (403) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados. Mientras que la línea de prueba (402) está aguas arriba de la línea de prueba (403) con respecto a la dirección del flujo (408) en las figuras, en modalidades alternativas, la línea de prueba (403) está aguas arriba de la línea de prueba (402). Aún en otras modalidades, las líneas de prueba (402) y (403) se ubican en la misma ubicación en la tira reactiva.

Opcionalmente, la zona de detección (405) puede contener líneas de prueba adicionales para detectar otros marcadores virales y/o bacterianos, así como también una línea de control (404). Por ejemplo, pueden detectarse proteína C reactiva y MxA en la misma tira reactiva. La línea de control (404) indica que el compañero de unión específica marcado viajó a lo largo del ensayo, aunque es posible que no se uniera a ningún marcador viral o bacteriano, lo que confirma el funcionamiento adecuado del ensayo. Como se muestra en las Figuras 9A a 9B, la zona de control (404) está, preferentemente, aguas abajo de las líneas de prueba (402) y (403). Sin embargo, en otros casos la zona de control (404) puede ubicarse aguas arriba de una o ambas líneas de prueba (402) y (403).

En algunos casos, la línea de control (404) incluye un anticuerpo u otra proteína recombinante que se une a un componente del medio de elución u otra composición que se usa en la prueba. En los casos en los que los ácidos nucleicos son los objetivos, la línea de control (404) incluye, preferentemente, un ácido nucleico complementario al ácido nucleico marcado que se usa como compañero de unión para el ácido nucleico objetivo.

Aunque en las figuras solo se muestra una línea de prueba para cada uno de los marcadores virales y bacterianos, pueden usarse múltiples líneas de prueba para ambos o cualquiera de los marcadores virales y bacterianos. En algunos casos donde hay múltiples objetivos bacterianos y/o virales, la presencia de cada objetivo corresponde, preferentemente, a una línea de prueba separada (402) o (403). En otras modalidades, tanto el marcador bacteriano como el marcador viral se detectan en una única línea de prueba. En estos casos, la presencia de un marcador bacteriano y un marcador viral en la misma línea de prueba tiene características diferentes a la presencia de un marcador bacteriano o viral solo. Por ejemplo, la presencia de un marcador bacteriano y un marcador viral en la misma línea de prueba puede indicarse visualmente mediante un color diferente al de la presencia de un marcador bacteriano o un marcador viral solo.

En algunos casos, los dispositivos descritos en la presente descripción incluyen una zona de lisis para ayudar a diferenciar infecciones virales y bacterianas. En estos casos, la muestra que se recogió no se lisa antes de su recogida y transferencia al dispositivo de análisis de muestras. Esto disminuye la cantidad de etapas necesarias para recoger y preparar la muestra para el análisis. Una situación en la que un agente de lisis mejora la eficiencia del ensayo es en el ensayo de la presencia de MxA. Como se analiza en la presente descripción, la presencia de esta proteína puede ayudar a distinguir entre infección bacteriana y viral en niños febriles. La lisis in situ mediante el uso de una combinación de 1 % a 6 % peso/volumen de CHAPS y 0,5 % a 2 % peso/volumen de NP40 como agente de lisis mejora la detección de MxA en sangre entera fresca o congelada. En otras modalidades, la lisis in situ usa urea, Tween 80 y/o una combinación de estos dos agentes de lisis.

Cuando se usa un agente de lisis, después de cargar la muestra, la muestra que viaja con el líquido de transporte (tampón) encontrará el agente de lisis. Preferentemente, el agente de lisis se cargará previamente en la tira reactiva y se eluirá mediante el líquido de transporte. En algunos casos, el agente de lisis se secó en la tira reactiva. Alternativamente, el agente de lisis puede secarse previamente mediante liofilización o liofilización y después cargarse

previamente en la tira reactiva. En otros casos, el agente de lisis puede absorberse, adsorberse, incrustarse o atraparse en la tira reactiva. El agente de lisis inicialmente seco se localiza, preferentemente, entre la zona de aplicación de muestra y una zona de reactivo. En casos de modalidades en las que la zona de reactivo está aguas arriba de la zona de aplicación de muestra, la zona de lisis está aguas abajo de la zona de aplicación de muestra. El agente de lisis es, preferentemente, soluble en el líquido de transporte de muestras, y el agente de lisis se solubiliza y activa tras el contacto con el líquido de transporte de muestras. El líquido de transporte de muestras contiene entonces tanto agente de lisis en solución o suspensión como componentes de muestra en suspensión. Cualquier componente susceptible de lisis en una muestra, que después se expone en suspensión al agente de lisis, se lisa in situ. Después, el tampón de ejecución transporta el analito, que incluye los componentes libres de lisis, a la zona de detección.

La ubicación donde se precarga y seca el agente de lisis puede variarse según sea necesario. Para maximizar el tiempo que la muestra tiene para interactuar con el agente de lisis así como también para minimizar la cantidad de agente de lisis que llega a la zona de detección, el agente de lisis seco, absorbido, adsorbido, incrustado o atrapado puede ubicarse en o simplemente aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra. O, para minimizar la distancia a lo largo de la cual debe viajar el producto de lisis antes de llegar a la zona de reactivo, el agente de lisis seco puede ubicarse más cerca de la zona de reactivo. En otros casos, el agente de lisis puede incluirse en el tampón de ejecución. En algunos casos, se incluyen agentes de lisis de NP-40 y sarcosilo en un tampón de ejecución que contiene Tris. En otros casos, se usan Tween 80 y urea como agentes de lisis en una tira reactiva de cromatografía de flujo lateral. En otros casos, se usan en combinación agentes de lisis en la tira (que incluyen Tween 80 y urea) y agentes de lisis en un tampón de ejecución que contiene Tris (que incluyen NP-40 y Sarcosilo).

La concentración de agente de lisis precargado en una tira reactiva está, preferentemente, entre 0,001 % y 5 % peso/volumen. El volumen que se va a precargar depende de dónde está precargado el agente de lisis. Los intervalos apropiados son de 1 a 10 microlitros cuando se cargan previamente en el vellón del recolector de muestras (la zona de aplicación de la muestra) o de 5 a 50 microlitros cuando se cargan previamente en la almohadilla absorbente o en otros lugares dentro de la tira reactiva. Idealmente, la cantidad precargada debe ser de aproximadamente 3 microlitros precargados en el vellón del recolector de muestras o aproximadamente 10 microlitros precargados en la almohadilla absorbente o en otras ubicaciones dentro de la tira reactiva.

La selección de un entorno y agente de lisis específicos dependerá de los marcadores virales y bacterianos y del ensayo. El pH y la fuerza iónica son claves para el entorno de lisis. En cuanto al pH establecido por el agente de lisis, un pH inferior a 4,0 tiende a precipitar materiales, especialmente proteínas. Un pH más alto, por encima de aproximadamente 10,0, tiende a lisar materiales como proteínas y paredes celulares. Por lo tanto, para muchas aplicaciones es preferible un pH de aproximadamente 10,0 o superior. Alternativamente, puede preferirse un pH más bajo para dianas de ácidos nucleicos.

En cuanto a la fuerza iónica establecida por el agente de lisis, para lisar pueden usarse tanto la fuerza iónica alta como la baja. Por ejemplo, una fuerza iónica más baja (hipotónica) tiende a descomponer los eritrocitos. Por ejemplo, el agua por sí sola puede lisar los eritrocitos. Pueden usarse entornos de mayor fuerza iónica para romper ciertas paredes y membranas celulares.

En cuanto a los agentes de lisis específicos, pueden agruparse y seleccionarse en función de sus propiedades: sales, agentes anfóteros y catiónicos, detergentes iónicos y no iónicos. La sal, cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), lisa los eritrocitos. Otras sales, que incluyen, pero no se limitan a, altas concentraciones de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) y cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ), pueden romper ciertas paredes y membranas celulares. Otros agentes de lisis son agentes anfóteros que incluyen, pero no se limita a, Lyso PC, CHAPS y Zwittergent. Alternativamente, pueden usarse como agente de lisis agentes catiónicos que incluyen, pero no se limitan a, C16 TAB y cloruro de benzalconio. A menudo se usan detergentes tanto iónicos como no iónicos para romper o lisar la pared celular o los componentes de la membrana celular, tales como las lipoproteínas y las glicoproteínas. Los detergentes iónicos comunes incluyen, pero no se limitan a, SDS, colato, lauroil sarcosinato de sodio (también conocido como sarcosilo) y desoxicolato. Los detergentes iónicos son buenos agentes solubilizantes. Los anticuerpos conservan su actividad en SDS al 0,1 % o menos. Los detergentes no iónicos comunes incluyen, pero no se limitan a, octilglucósido, digitonina, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, NP-40 (por ejemplo, Tergitol® NP-40), Tween 20 y Tween 80. Los detergentes iónicos suaves y no iónicos son desnaturizantes más débiles y, a menudo, se usan para solubilizar proteínas de membrana, tales como las proteínas de superficie viral. Los agentes de lisis adicionales incluyen, pero no se limitan a, urea y enzimas. Pueden usarse combinaciones de diferentes agentes de lisis para optimizar el entorno de lisis.

En la descripción, se usan Tween 80 y urea como agentes de lisis en una tira reactiva de cromatografía de flujo lateral. En otras modalidades preferidas, los agentes de lisis en un tampón de ejecución que contiene Tris incluyen NP-40 y Sarcosilo. En otros casos, se usan en combinación agentes de lisis en la tira (que incluyen Tween 80 y urea) y agentes de lisis en un tampón de ejecución que contiene Tris (que incluyen NP-40 y Sarcosilo).

Los surfactantes son generalmente agentes humectantes y reducen la tensión superficial de un líquido. Esto permite una distribución más fácil al reducir la tensión interfacial entre los líquidos. Por tanto, los surfactantes pueden interferir con la unión natural de antígenos y anticuerpos o ligandos y receptores. Por tanto, las concentraciones se eligen

experimentalmente para cada clase de agente de lisis. Una vez que se produce la lisis, es importante que no se obstaculicen las reacciones de unión deseadas. Generalmente, la concentración del agente de lisis al 0,001 % se considera el límite inferior y el límite superior es aproximadamente el 1 %. Hay un efecto sinérgico o aditivo cuando se usan combinaciones de agentes de lisis. Esto amplía el intervalo de concentración de trabajo para que vaya desde aproximadamente 0,001 % a 1 %. Finalmente, puede evitarse alguna unión no específica indeseable con una concentración de Tween 20 del 5 %. En todos los casos, la cantidad total de agente de lisis precargado en todas las ubicaciones de una tira reactiva individual debe ser suficiente para lisar las barreras para la inmunodetección, lo que permite el funcionamiento práctico de la tira reactiva.

El agente de lisis en sí no debe interferir con ningún otro detector o agente indicador del ensayo y, por lo tanto, no interfiere con ninguna otra interacción y reacción del ensayo hasta tal punto que impida el funcionamiento práctico del ensayo. Un agente de lisis debe tener una vida útil suficiente para permitir su fabricación, distribución y almacenamiento antes de usar una tira reactiva en pruebas en el lugar de atención.

En modalidades preferidas en las que MxA es el marcador viral, se usa, preferentemente, la lisis in situ mediante el uso de una combinación de 1 % a 6 % peso/volumen de CHAPS y 0,5 % a 2 % peso/volumen de NP40 como agente de lisis. Como ejemplo más específico, 2 microlitros de tampón HEPES 100 mM (pH 8,0) que contiene 5 % de CHAPS y 2 % de NP-40 con cloruro de sodio 150 mM, BSA al 0,1 % y azida de sodio al 0,1 % (todos los porcentajes peso/volumen) se secan sobre una zona de lisis de una tira reactiva.

En las Figuras 10A a 10D, la muestra se aplica a la zona de aplicación (201) en una tira de prueba cromatográfica (200). La muestra pasa por una zona de lisis (250), donde, preferentemente, se precarga un agente de lisis en la tira reactiva y se eluirá mediante el líquido de transporte. El agente de lisis lisa cualquier componente susceptible de lisis en la muestra in situ.

La tira de prueba cromatográfica contiene una zona de aplicación de muestra (201), una zona de lisis (250) que contiene un agente de lisis y una zona de reactivo (260) que contiene al menos un compañero de unión marcado que se une a un marcador viral y al menos un compañero de unión marcado que se une a un marcador bacteriano que se eluye y después puede migrar con un líquido de transporte de muestras (por ejemplo, una solución tampón). Si bien la zona de reactivo (260) se muestra aguas abajo de la zona de aplicación de muestra en estas figuras, en modalidades alternativas, la zona de reactivo (260) podría estar aguas arriba de la zona de aplicación de muestra (ver Figura 10B), siempre que los reactivos encuentren la muestra en algún momento después de que la muestra alcanza la zona de lisis y se lisa efectivamente. Los compañeros de unión marcados son capaces de unirse específicamente a un marcador viral o bacteriano de interés para formar un complejo que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo o compañero de unión específico en la zona de detección. Aunque no se muestran en estas Figuras, una almohadilla absorbente, así como también otros componentes conocidos de inmunoensayo de flujo lateral que incluyen, pero no se limitan a, una zona de desechos, un respaldo de soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para la lectura de resultados, pueden opcionalmente también puede ser un componente de la tira reactiva (200).

En esta descripción, el agente de lisis se localiza en la zona de lisis (250) entre la zona de aplicación de muestra (201) y la zona de reactivo (260). El agente de lisis es, preferentemente, soluble o miscible en el líquido de transporte de muestras, y el agente de lisis se solubiliza y activa tras el contacto con el líquido de transporte de muestras. El líquido de transporte de muestras contiene entonces tanto el agente de lisis en solución o suspensión como los componentes de la muestra en suspensión. Cualquier componente susceptible de lisis en una muestra, que después se expone en suspensión al agente de lisis, se lisa in situ. Después, el tampón de ejecución transporta la muestra, que incluye los componentes libres de lisis, a la zona de detección (205).

La zona de lisis (250) se ubica, preferentemente, entre la zona de aplicación de muestra (201) y la zona de reactivo (260), como se muestra en la Figura 10A. En otros casos, la zona de lisis (250) se solapa con la zona de aplicación de muestra (201), la zona de reactivo (260) o tanto la zona de aplicación de muestra (201) como la zona de reactivo (260) como se muestra en las Figuras 10B, 10C y 10D, respectivamente. Tenga en cuenta que las figuras son esquemáticas y no se dibujan a escala. La cantidad de solapamiento entre las diferentes zonas (como se muestra en las Figuras 10B a 10D) puede ser muy variable.

La tira reactiva (200) también incluye una zona de detección (205) que contiene una primera sección para la detección de al menos un marcador bacteriano, por ejemplo, una línea de prueba (203), que incluye un compañero de unión específica inmovilizado, complementario al conjugado bacteriano formado por el marcador bacteriano y su compañero de unión marcado. Por lo tanto, en la línea de prueba (203), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan los compañeros de unión marcados con bacterias de la zona de reactivos (260) junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización de los marcadores bacterianos con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (203). En la línea de prueba (203), la presencia de un marcador bacteriano se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (203) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados.

La zona de detección (205) también incluye una segunda sección para la detección de al menos un marcador viral, por ejemplo, una línea de prueba (202), que incluye un compañero de unión específica inmovilizado, complementario al conjugado viral formado por el marcador viral y su compañero de unión marcado. Por lo tanto, en la línea de prueba (202), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan a los compañeros de unión marcados con virus de la zona de reactivo (260) junto con sus marcadores virales unidos. Esta localización de los marcadores virales con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (202). En la línea de prueba (202), la presencia de un marcador viral se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (202) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados. Mientras que la línea de prueba (203) está aguas arriba de la línea de prueba (202) con relación a la dirección del flujo (208) en las figuras, en casos alternativos, la línea de prueba (202) está aguas arriba de la línea de prueba (203). En otros casos más, las líneas de prueba (202) y (203) se ubican en la misma ubicación en la tira reactiva.

Opcionalmente, la zona de detección (205) puede contener líneas de prueba adicionales para detectar otros marcadores bacterianos y/o virales, así como también una línea de control (204). La línea de control (204) indica que el compañero de unión específica marcado viajó a lo largo del ensayo, aunque es posible que no se uniera a ningún marcador, lo que confirma el funcionamiento adecuado del ensayo. Como se muestra en las Figuras 10A a 10D, la zona de control (204) está, preferentemente, aguas abajo de las líneas de prueba (203) y (202). Sin embargo, en otros casos, la zona de control (204) puede ubicarse aguas arriba de una o ambas líneas de prueba (203) y (202).

En algunos casos, la línea de control (204) incluye un anticuerpo u otra proteína recombinante que se une a un componente del medio de elución u otra composición que se usa en la prueba. En los casos en los que los ácidos nucleicos son los objetivos, la línea de control (204) incluye, preferentemente, un ácido nucleico complementario al ácido nucleico marcado que se usa como compañero de unión para el ácido nucleico objetivo.

Aunque en las figuras solo se muestra una línea de prueba, hay varias líneas de prueba dentro de los casos de descripción. En algunos casos donde hay múltiples objetivos, la presencia de cada objetivo corresponde, preferentemente, a una línea de prueba separada (202). En otros casos en los que hay múltiples objetivos, la presencia de múltiples objetivos puede indicarse en la misma línea de prueba de manera que la presencia de más de un objetivo tenga características diferentes a la presencia de un único objetivo. Por ejemplo, la presencia de múltiples objetivos en la misma línea de prueba puede indicarse visualmente mediante un color diferente al de la presencia de cada uno de los objetivos solo.

En otros casos, es posible tener uno o más agentes de lisis suaves en el propio tampón de ejecución. En estos casos, no hay ningún efecto adverso en la zona de reactivo que estará aguas abajo y la muestra puede estar aguas arriba o aguas abajo de la zona de reactivo. Una enzima de lisis en el tampón en ejecución puede "dirigirse" a su sustrato y cortarlo para abrir la membrana celular o la pared celular. Por ejemplo, la penicilina puede cortar o "perforar un agujero" en una bacteria susceptible. En otros casos, cuando se aplica el agente de lisis al material de recogida de muestras, entonces la zona de reactivo puede estar aguas arriba de la zona de aplicación de muestra. En algunos casos preferidos, los agentes de lisis en un tampón de ejecución que contiene Tris incluyen NP-40 y Sarcosilo.

Por ejemplo, se secan uno o más agentes de lisis sobre la zona de aplicación de muestra de una tira de flujo lateral. Por tira, el agente de lisis está hecho de aproximadamente 2 microlitros de tampón HEPES 100 mM (pH 8,0) que contiene 5 % de CHAPS y 2 % de NP-40 con cloruro de sodio 150 mM, 0,1 % de BSA y 0,1 % de azida de sodio (todos los porcentajes peso/volumen). Después se adicionan hasta 10 microlitros de sangre entera a la zona de aplicación de la muestra para ser lisada in situ. La proteína MxA se libera desde el interior de los glóbulos blancos para reaccionar con un anticuerpo monoclonal para MxA en una etiqueta visual (oro coloidal o perlas de látex visibles). Este complejo atraviesa un tampón de ejecución que contiene Triton X-100 y es capturado por anticuerpos monoclonales para MxA inmovilizados en la línea de prueba de la membrana de nitrocelulosa. Esta unión en la línea de prueba da lugar a una indicación visible.

En otros ejemplos, se usan Tween 80 y urea como agentes de lisis en una tira reactiva de cromatografía de flujo lateral.

Algunos ejemplos de formatos de ensayo para determinar la prolactina cuando se determinan MxA y/o proteína C reactiva de flujo lateral incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos, métodos de inmunotransferencia, reacciones de aglutinación, una reacción de fijación del complemento, una reacción hemolítica, una precipitación, reacción, un método de coloide de oro, un método de cromatografía, fosforescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X, absorción de rayos X, magnetismo, emisiones resonantes fluorescentes o un método de inmunotinción. Algunos ejemplos de inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación, radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA o ELISA), dispositivo de inmunoensayo Vidas® (Biomérieux, Hazelwood, Missouri), inmunoensayos fluorescentes (FIA), un sistema portátil de mano i-Stat® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois), un sistema de diagnóstico portátil de Philips (Philips Handheld Diagnostics, Países Bajos), inmunoensayos quimioluminiscentes, ensayos fisicoquímicos (TIA, LAPIA o PCIA), inmunoensayos de flujo lateral o citometría de flujo. Algunos inmunoensayos preferidos para estos biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, ELISA, inmunoensayos de fluorescencia, ensayos magnéticos, ensayos paramagnéticos y ensayos quimioluminiscentes. En otros casos, pueden usarse el ARNm o transcripciones genéticas. En algunos casos

preferidos, los ensayos se automatizan. Los ensayos para MxA y/o proteína C reactiva también pueden usar alternativamente cualquiera de los sistemas y dispositivos de ensayo anteriores.

Un ejemplo particular de un dispositivo para determinar la presencia de proteína C reactiva, MxA y/o procalcitonina es un sistema de inmunoensayo multiparamétrico que es capaz de detectar dos o más de estos objetivos en el mismo dispositivo. En algunos casos preferidos, los dispositivos son capaces de detectar niveles de MxA superiores o iguales a entre 25 ng/ml y 35 ng/ml, niveles bajos de CRP superiores o iguales a 20 mg/l, niveles altos de CRP superiores o iguales a 80 mg/l y niveles de procalcitonina de al menos 0,1 ng/ml. En otros casos, los dispositivos son capaces de cuantificar los niveles de estos biomarcadores.

Un sistema de inmunoensayo multiparamétrico que podría usarse es un dispositivo de inmunoensayo Vidas® (Biomérieux, Hazelwood, Missouri), que podría detectar la presencia de uno, dos, tres o los cuatro objetivos (MxA, procalcitonina, CRP baja y CRP alta) simultáneamente. El dispositivo de inmunoensayo Vidas® es un ensayo de fluorescencia ligado a enzimas (ELFA) (también disponible en una versión compacta llamada Mini Vidas®) y se usa ampliamente en laboratorios clínicos. Otros dispositivos que podrían usarse incluyen un sistema de inmunodiagnóstico Vitek® (Biomérieux, Hazelwood, Missouri) o un sistema de inmunoensayo Luminex® (Luminex Corporation, Austin, Texas). Otro ejemplo es un dispositivo similar a un sistema portátil de mano i-Stat® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, ver los dispositivos descritos en patentes de EE. UU. núm. 5,638,828, 5,666,967, 5,653,243, 5,779,650, 6,010,463, 6,845,327, 6,896,778, 7,419,821, y 8,017,382). Otro ejemplo más es un dispositivo que combina la separación de partículas magnéticas con la detección quimioluminiscente, tal como el sistema de inmunoensayo multiparamétrico BioFlash (Biokit, Barcelona, España). Cualquier lectura no subjetiva, tal como dispositivos de lectura mecánica, podría usarse para determinar los niveles de los biomarcadores descritos en la presente descripción.

Dispositivo de análisis de muestras con tiras reactivas duales bimodales en combinación con pruebas de procalcitonina

Las tiras reactivas duales bimodales pueden usarse para diferenciar infecciones bacterianas y virales en humanos, pero también pueden usarse en aplicaciones veterinarias para animales. Dado que la proteína C reactiva difiere en dependencia de la especie, no existen anticuerpos comunes contra la proteína C reactiva entre especies. Por lo tanto, las pruebas veterinarias deben incluir proteína C reactiva específica de la especie particular que se analiza. MxA se conserva bien entre especies, por lo que es posible usar MxA humana en pruebas veterinarias. Sin embargo, MxA para una especie particular podría usarse alternativamente para intentar aumentar aún más la especificidad. Pueden desarrollarse pruebas veterinarias que usan las tiras reactivas duales bimodales descritas en la presente descripción para una especie específica, que incluyen, pero no se limitan a, gatos, perros, conejos, cerdos, ovejas, caballos, vacas, monos, chimpancés, babuinos y orangutanes.

Podría fabricarse una tira con MxA y CRP baja con cualquier configuración, por ejemplo las configuraciones mostradas en las Figuras 9A y 9B, o las Figuras 10A a 10D, donde MxA es el marcador viral que se detecta y niveles relativamente bajos de proteína C reactiva son el marcador bacteriano que se detecta. En otros casos, la línea de prueba MxA y la línea de prueba de proteína C reactiva podrían superponerse o estar en la misma ubicación en la tira reactiva. En estas modalidades, la presencia de CRP y MxA bajas en la misma línea de prueba tiene características diferentes a la presencia de un marcador bacteriano o viral solo. Por ejemplo, la presencia de CRP baja y MxA en la misma línea de prueba puede indicarse visualmente mediante un color diferente que la presencia de MxA o CRP baja sola. En estos casos, un resultado positivo para MxA daría un color o indicación diferente que un resultado positivo para CRP baja, de manera que la persona que lee el ensayo podría distinguir entre un resultado completamente negativo, un resultado positivo para MxA, un resultado positivo para baja CRP, y resultado positivo tanto para MxA como para CRP baja. Por ejemplo, un resultado positivo para MxA podría dar lugar a una línea de prueba roja, y un resultado positivo para CRP baja podría dar lugar a una línea de prueba azul. Entonces, cuando una muestra es positiva tanto para MxA como para CRP baja, la línea es visiblemente violeta.

Algunos dispositivos de ensayo de flujo lateral para detectar niveles elevados de CRP se muestran en las Figuras 11A-11B y 12A-12D. Estas configuraciones son similares a las configuraciones mostradas en las Figuras 9A-9B y 10A-10D, sin una línea de prueba para un marcador viral, y se usan los mismos números de referencia para los mismos componentes de la tira (600), (700).

Las Figuras 11A y 11B muestran una tira de prueba cromatográfica (600) con una línea de prueba (623) que detecta la presencia de un marcador bacteriano, tal como niveles altos de proteína C reactiva. La muestra se aplica a la zona de aplicación (401) de la tira de prueba cromatográfica (600). La muestra viaja a lo largo de la dirección del flujo (408). Como se muestra en la Figura 11A, la muestra después pasa por una zona de reactivo (660) que contiene al menos un compañero de unión bacteriano marcado que se eluye y después puede migrar con un líquido de transporte de muestra (por ejemplo, una solución tampón). Alternativamente, como se muestra en la Figura 11B, la zona de reactivo (660) se ubica aguas arriba de la zona de aplicación de muestra (401) de manera que los compañeros de unión marcados en la zona de reactivo se eluyen por el líquido de transporte de muestra y viajan a la muestra. El compañero de unión bacteriano marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador bacteriano de interés, por ejemplo, niveles elevados de proteína C reactiva, para formar un complejo que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo o compañero de unión específica en la zona de detección. Aunque no se muestran en estas Figuras, una almohadilla absorbente, así como también otros componentes conocidos de inmunoensayo de flujo lateral que



incluyen, pero no se limitan a, una zona de desechos, un respaldo de soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para la lectura de resultados, pueden opcionalmente también ser un componente de la tira reactiva (600) en estas modalidades.

La tira reactiva (600) también incluye una zona de detección (605) que contiene una sección para la detección de un marcador bacteriano, por ejemplo, una línea de prueba (623), que incluye un compañero de unión específica inmovilizado, complementario al complejo reactivo bacteriano formado por el marcador bacteriano y su compañero de unión marcado. Por lo tanto, en la línea de prueba (623), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan los compañeros de unión bacterianos marcados de la zona de reactivos (660) junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización del marcador bacteriano con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (623). En la línea de prueba (623), la presencia del marcador bacteriano se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (623) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados.

Opcionalmente, la zona de detección (605) puede contener líneas de prueba adicionales para detectar otros marcadores bacterianos y/o virales, así como también una línea de control (404). La línea de control (404) indica que el compañero de unión específica marcado viajó a lo largo del ensayo, aunque es posible que no se uniera a ningún marcador bacteriano, lo que confirma el funcionamiento adecuado del ensayo. Como se muestra en las Figuras 11A a 11B, la zona de control (404) está, preferentemente, aguas abajo de la línea de prueba (623). Sin embargo, en otros casos, la zona de control (404) puede ubicarse aguas arriba de la línea de prueba (623).

En algunos casos, la línea de control (404) incluye un anticuerpo u otra proteína recombinante que se une a un componente del medio de elución u otra composición que se usa en la prueba. En los casos en los que los ácidos nucleicos son los objetivos, la línea de control (404) incluye, preferentemente, un ácido nucleico complementario al ácido nucleico marcado que se usa como compañero de unión para el ácido nucleico objetivo.

En otras modalidades para probar un marcador bacteriano, tal como niveles altos de CRP, como se muestra en las Figuras 12A a 12D, la muestra pasa por una zona de lisis (250), donde, preferentemente, se precarga un agente de lisis en la tira reactiva y se eluye por el líquido de transporte. El agente de lisis lisa cualquier componente susceptible de lisis en la muestra in situ.

La tira de prueba cromatográfica (700) contiene una zona de aplicación de muestra (201), una zona de lisis (250) que contiene un agente de lisis y una zona de reactivo (760) que contiene al menos un compañero de unión marcado que se une a un marcador bacteriano, por ejemplo altos niveles de proteína C reactiva, que se eluye y después puede migrar con un líquido de transporte de muestras (por ejemplo, una solución tampón). Si bien la zona de reactivo (760) se muestra aguas abajo de la zona de aplicación de muestra en estas figuras, en modalidades alternativas, la zona de reactivo (760) podría estar aguas arriba de la zona de aplicación de muestra (ver Figura 11B), siempre que los reactivos encuentren la muestra en algún momento después de que la muestra alcanza la zona de lisis y se lisa efectivamente. El compañero de unión marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador bacteriano de interés, por ejemplo, niveles elevados de proteína C reactiva, para formar un complejo que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo o compañero de unión específica en la zona de detección. Aunque no se muestran en estas Figuras, una almohadilla absorbente, así como también otros componentes conocidos de inmunoensayo de flujo lateral que incluyen, pero no se limitan a, una zona de desechos, un respaldo de soporte, una carcasa y una abertura en la carcasa para la lectura de resultados, pueden opcionalmente también ser un componente de la tira reactiva (700) en estos ejemplos.

En un caso, el agente de lisis se localiza en la zona de lisis (250) entre la zona de aplicación de muestra (201) y la zona de reactivo (760). El agente de lisis es, preferentemente, soluble o miscible en el líquido de transporte de muestras, y el agente de lisis se solubiliza y activa tras el contacto con el líquido de transporte de muestras. El líquido de transporte de muestras contiene entonces tanto el agente de lisis en solución o suspensión como los componentes de la muestra en suspensión. Cualquier componente susceptible de lisis en una muestra, que después se expone en suspensión al agente de lisis, se lisa in situ. Después, el tampón de ejecución transporta la muestra, que incluye los componentes libres de lisis, a la zona de detección (705).

La zona de lisis (250) se ubica, preferentemente, entre la zona de aplicación de muestra (201) y la zona de reactivo (760), como se muestra en la Figura 12A. En otros casos, la zona de lisis (250) se superpone a la zona de aplicación de muestra (201), la zona de reactivo (760) o tanto la zona de aplicación de muestra (201) como la zona de reactivo (260) como se muestra en las Figuras 12B, 12C y 12D, respectivamente. Tenga en cuenta que las figuras son esquemáticas y no se dibujan a escala. La cantidad de superposición entre las diferentes zonas (como se muestra en las Figuras 12B a 12D) puede ser muy variable.

La tira reactiva (700) también incluye una zona de detección (705) que contiene una sección para la detección de al menos un marcador bacteriano, por ejemplo, una línea de prueba (723), que incluye un compañero de unión específica inmovilizado, por ejemplo, un compañero de unión específica para un alto nivel de proteína C reactiva, complementario al conjugado bacteriano formado por el marcador bacteriano y su compañero de unión marcado. Por lo tanto, en la línea de prueba (723), los compañeros de unión de la zona de detección atrapan los compañeros de unión marcados

con bacterias de la zona de reactivos (760) junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización de los marcadores bacterianos con sus compañeros de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de prueba (723). En la línea de prueba (723), la presencia de un marcador bacteriano se determina mediante lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de prueba (723) resultante de la acumulación de compañeros de unión marcados.

Opcionalmente, la zona de detección (705) puede contener líneas de prueba adicionales para detectar otros marcadores bacterianos y/o virales, así como también una línea de control (204). La línea de control (204) indica que el compañero de unión específica marcado viajó a lo largo del ensayo, aunque es posible que no se uniera a ningún marcador, lo que confirma el funcionamiento adecuado del ensayo. Como se muestra en las Figuras 12A a 12D, la zona de control (204) está, preferentemente, aguas abajo de la línea de prueba (723). Sin embargo, en otros casos, la zona de control (204) puede ubicarse aguas arriba de la línea de prueba (723).

En algunos casos, la línea de control (204) incluye un anticuerpo u otra proteína recombinante que se une a un componente del medio de elución u otra composición que se usa en la prueba. En los casos en los que los ácidos nucleicos son los objetivos, la línea de control (204) incluye, preferentemente, un ácido nucleico complementario al ácido nucleico marcado que se usa como compañero de unión para el ácido nucleico objetivo.

Una configuración preferida para un dispositivo de análisis de muestras de tira reactiva dual bimodal se muestra en las Figuras 13A a 13C. El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta de prueba (800) incluye una carcasa que puede cerrarse (835) con dos lados (836), (837) y un lomo o porción bisagra (831). En un caso preferido, la tarjeta de prueba (800) tiene aproximadamente 11,5 cm de largo (L) x 7 cm de ancho (W) cuando los dos lados (836), (837) están cerrados. Sin embargo, puede usarse una tarjeta de prueba de cualquier tamaño (800) que se adapte a todos los componentes. Dentro del primer lado (836) de la carcasa (835), hay dos tiras reactivas (815), (825), que incluyen cada una una almohadilla receptora (845), una zona de desvío (850), una almohadilla de transferencia (855) y una zona de detección (805). El primer lado (836) también incluye una almohadilla absorbente (840) y, preferentemente, una almohadilla de desechos (860). La primera tira reactiva (815) incluye, preferentemente, una zona de detección (805) con una línea de prueba MxA (802), una línea de prueba de CRP baja (803) y una línea de control (804). La segunda tira reactiva (825) incluye, preferentemente, una zona de detección (805) con una línea de prueba de CRP alta (823) y una línea de control (804). Todas las líneas de prueba son visibles a través de las ventanas (865) en el segundo lado (837) de la carcasa (835) cuando la carcasa (835) está cerrada. La almohadilla absorbente (840) es, preferentemente, una almohadilla única a la que se adiciona el tampón de ejecución para iniciar el flujo lateral. De manera similar, la almohadilla de desechos (860) es, preferentemente, una almohadilla única que recoge el exceso de tampón en ejecución al final de la prueba. Sin embargo, en otros casos, cada tira podría tener una almohadilla absorbente (840) y/o una almohadilla de desechos (860) separada.

El segundo lado (837) de la carcasa (835) incluye tres secciones separadas (838), (839) y (870). La porción media, un compresor o aleta de muestra (870), incluye, preferentemente, dos zonas de conjugados (872), (874), que incluyen cada una un compañero de unión marcado para al menos un analito, y un control marcado. En algunos casos, el compresor de muestra (870) es cualquiera de los compresores de muestra descritos en patente de EE. UU. núm. 8,609,433, titulada "Multiplanar Lateral flow Assay with Sample Compressor", publicada el 17 de diciembre de 2013. Una ventana (843) se ubica en la porción inferior (838) del segundo lado (837) de la carcasa para que el tampón pueda adicionarse a la almohadilla absorbente (840) cuando la carcasa (835) está cerrada. Las ventanas de visualización (865) para las zonas de detección (805) están en la porción superior (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835).

La porción superior (839) y la porción inferior (838) del segundo lado (837) de la carcasa (835) también incluyen, preferentemente, cada una al menos una perilla, clavija o protrusión (875) que coincide con uno o más orificios (895) de manera que las porciones superior e inferior (838), (839) puedan sujetarse fácilmente en el primer lado (836) de la carcasa (835). En un caso preferido, hay dos clavijas (875) en la porción inferior (838) que coinciden con dos orificios (895) que flanquean la almohadilla absorbente (840) en el primer lado (836) de la carcasa (835) y dos clavijas (875) en la porción superior (839) que coinciden con dos orificios (895) que flanquean la almohadilla de desechos (860) en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otras modalidades, los orificios (895) están en el segundo lado (837) de la carcasa (835) y las clavijas (875) están en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otros casos más, podrían usarse otros mecanismos de sujeción reversibles para asegurar la porción superior (838) y/o la porción inferior (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835) al primer lado (836) de la carcasa (835). En otras modalidades, las secciones superior e inferior (838), (839) se cierran permanentemente, por ejemplo mediante el uso de un adhesivo, antes de su uso.

La aleta (870), también conocida como compresor de muestra, en el segundo lado (837) de la carcasa incluye dos zonas de conjugados (872), (874) y dos zonas de aplicación de muestra (873), (876), y puede ser abrir y cerrar fácilmente. La aleta (870) también incluye, preferentemente, al menos una perilla, clavija o protrusión (875) que coincide con uno o más orificios (895) de manera que la aleta (870) se cierre fácilmente y correctamente en el primer lado (836) de la carcasa (835) después de que la muestra se adicione a las zonas de aplicación de muestra (873), (876). En otros casos, los orificios (895) están en el segundo lado (837) de la carcasa (835) y las clavijas (875) están en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otros casos más, podrían usarse otros mecanismos de sujeción reversibles para asegurar la aleta (870) al primer lado (836) de la carcasa (835).

Las zonas de conjugado (872), (874) y las zonas de aplicación de muestra (873), (876), preferentemente, se solapan. En casos preferidos, las zonas de conjugado (872), (874) se colorean debido a los tintes en los conjugados de muestra y los conjugados de control, y la muestra se coloca directamente sobre la porción coloreada de la aleta (870). En un caso preferido, la zona de conjugado (872) que se usa para la primera tira reactiva (815) contiene un compañero de unión de MxA que se marca con un tinte rojo, un compañero de unión de CRP baja que se marca con un tinte negro y un compañero de unión de control que se marca con un tinte azul. En este caso, la zona de conjugado (872) aparece de color violáceo. La otra zona de conjugado (874) contiene un compañero de unión con alto contenido de CRP que se marca con un tinte negro y un compañero de unión de control que se marca con un tinte azul. En este caso, la zona de conjugado (874) aparece azulada.

La zona de desvío (850) incluye, preferentemente, un espacio o barrera que interrumpe el flujo lateral, y desvía el tampón de ejecución hacia la aleta (870) que incluye las zonas de conjugados (872), (874) y las zonas de aplicación de muestra (873), (876). En algunos casos, la zona de desvío es cualquiera de las zonas de desvío descritas en patente de EE. UU. núm. 8,815,609, titulada "Multiplanar Lateral flow Assay with Zone", publicada el 26 de agosto de 2014.

En operación, las porciones superior e inferior (838), (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835) se cierran, preferentemente, antes de su uso mediante el aseguramiento de las clavijas (875) a los orificios (895). El dispositivo de análisis de muestras, o tarjeta de prueba (800), se coloca, preferentemente, sobre una superficie plana. Si la aleta (870) aún no está abierta, el usuario la abre para acceder a las zonas de aplicación de muestra (873), (876). Se toma del paciente una muestra de sangre para analizarla. La muestra puede tomarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En un caso preferido, se adiciona una muestra de 5 µl de sangre a cada una de las zonas de aplicación de muestra (873), (876) y después se cierra la solapa (870). Preferentemente, cada una de las muestras de 5 µl se recoge independientemente entre sí. Las muestras de sangre se adicionan, preferentemente, directamente al dispositivo (800), sin ningún tratamiento previo.

Para garantizar que el compresor de muestra o la aleta (870) se cierre correctamente, preferentemente, se aplica presión a la carcasa (835) por encima de las clavijas (875) para cerrar las clavijas (875). La parte superior de la aleta (870) debe estar a ras con la parte superior del resto del segundo lado (837) de la carcasa (835) para que la prueba se realice correctamente. Se adiciona un tampón de ejecución a la almohadilla absorbente (840), que inicia el flujo lateral (885). En casos preferidos, el tampón de ejecución incluye uno o más agentes de lisis, por ejemplo detergentes, para lisar la muestra de sangre y exponer la MxA intracelular en la muestra. En algunos casos preferidos, los agentes de lisis NP-40 y sarcosilo se incluyen en un tampón de ejecución que contiene Tris.

Cuando el tampón de ejecución llega a la zona de desvío (850), se desvía hacia la aleta (870). Viaja a través de las zonas de conjugado (872), (874), recoge cualquier complejo formado entre el compañero de unión de MxA y MxA en la muestra, el compañero de unión de CRP baja y los niveles bajos de proteína C reactiva en la muestra, el compañero de unión de CRP alta y altos niveles de proteína C reactiva en la muestra, así como también el conjugado de control.

Dado que las zonas de conjugado (872), (874) unen la zona de desviación (850) en las tiras de prueba de flujo lateral (815), (825), el tampón de ejecución, que ahora contiene la muestra, el conjugado y los complejos descritos anteriormente, después viaja hacia la plataforma de transferencia (855) y hacia las zonas de detección (805) en cada una de las tiras reactivas (815), (825). Si MxA está presente en la muestra, la línea de prueba de MxA (802) en la primera tira reactiva (815) será roja. Si hay un nivel umbral bajo de proteína C reactiva presente en la muestra, la línea de prueba de CRP baja (803) en la primera tira reactiva (815) será negra. Si en la muestra hay un nivel umbral alto de proteína C reactiva, la línea de prueba de CRP alta (823) en la segunda tira reactiva (825) será negra. Si la prueba se realiza correctamente, las líneas de control (804) tanto en la primera tira (815) como en la segunda tira reactiva (825) serán azules. En modalidades preferidas, los niveles de detección son 40 ng/ml para MxA, 10 mg/l para CRP baja en la primera tira reactiva (815) y 80 mg/l para CRP alta en la segunda tira reactiva (825). En otras modalidades preferidas, los niveles de detección son 25 ng/ml para MxA, 20 mg/l para CRP baja en la primera tira reactiva (815) y 80 mg/l para CRP alta en la segunda tira reactiva (825). Podría usarse cualquier combinación de estos diferentes valores de corte. Los resultados de la prueba deberían ser visibles después de aproximadamente 5-20 minutos, preferentemente, dentro de aproximadamente 10 minutos.

Dado que el compañero de unión de control está en el compresor o aleta de muestra (870) y no en ninguna de las tiras reactivas (815), (825), existe un verdadero control de procedimiento para esta configuración. Si la aleta (870) no se cierra correctamente, no aparecerá nada en la zona de detección (805), lo que indica que la prueba se realizó incorrectamente.

Las Figuras 14A a 14F muestran los resultados de las pruebas mediante el uso del dispositivo (800) mostrado en las Figuras 13A a 13C, con dos tiras reactivas (815), (825) una al lado de la otra, donde una primera tira reactiva (815) comprueba la presencia de MxA y niveles bajos de proteína C reactiva y la segunda tira reactiva (825) analiza niveles altos de proteína C reactiva.

La Figura 14A muestra un resultado negativo en la línea de prueba de MxA (802) y un resultado negativo en la línea de prueba de CRP baja (803) en la primera tira reactiva (815), así como también un resultado negativo en la línea de

prueba de CRP alta (823) en la segunda tira reactiva (825). Más específicamente, las únicas líneas visibles en la zona de detección (805) del ensayo de flujo lateral (800) son las dos líneas de control azules (804). Este resultado indica que la muestra es negativa tanto para infección viral como bacteriana. Un paciente con este resultado, en ausencia de pruebas adicionales, se consideraría microbiológicamente no confirmado.

Las Figuras 14B y 14C son positivas para infección viral. En la Figura 14B, la presencia de dos líneas de control azules (804) y una línea roja de MxA (802) indican una infección viral. En la Figura 14C, la presencia de dos líneas de control azules (804) y una línea roja de MxA (802) indican una infección viral. Dado que también hay una línea negra de CRP baja (803) en la Figura 14C, existe la posibilidad de coinfección bacteriana, aunque hay ausencia de una línea de CRP alta (823). Cada vez que MxA da positivo en esta prueba, indica una infección viral.

Las Figuras 14D y 14E son positivas para infección bacteriana. En la Figura 14D, la presencia de dos líneas de control azules (804) y una línea negra de CRP baja (803) indica una infección bacteriana. En la Figura 14E, la presencia de dos líneas de control azules (804), una línea negra de CRP baja (803) y una línea negra de CRP alta (823) también indica una infección bacteriana. La línea de MxA está ausente en las Figuras 14D y 14E, lo que indica una ausencia de infección viral.

La Figura 14F indica infección viral o coinfección (infección tanto bacteriana como viral). La presencia de dos líneas de control azules (804), una línea roja de MxA (802), una línea negra de CRP baja (803) y una línea negra de CRP alta (823) indica una infección viral o una posible coinfección. En la mayoría de los casos, el paciente solo tendrá una infección viral. Si bien existe la posibilidad de coinfección, los solicitantes no observaron coinfección en sus estudios.

Otra configuración preferida para un dispositivo de análisis de muestras de tira reactiva dual bimodal (1000) se muestra en las Figuras 15A a 15C. Esta configuración es similar a la configuración (800) mostrada en las Figuras 13A a 13C, pero las zonas de aplicación de muestra (1073), (1076) se ubican en cada una de las tiras reactivas (1015), (1025), aguas abajo de la zona de desvío (850). El dispositivo de análisis de muestras o tarjeta de prueba (1000) incluye una carcasa que puede cerrarse (835) con dos lados (836), (837) y un lomo o porción bisagra (831). En una modalidad preferida, la tarjeta de prueba (1000) tiene aproximadamente 11,5 cm de largo (L) x 7 cm de ancho (W) cuando los dos lados (836), (837) están cerrados. Sin embargo, puede usarse una tarjeta de prueba de cualquier tamaño (1000) que se adapte a todos los componentes. Dentro del primer lado (836) de la carcasa (835), hay dos tiras reactivas (1015), (1025), cada una de las cuales incluye una almohadilla receptora (845), una zona de desvío (850), una almohadilla de transferencia (1055) y una zona de detección (805). El primer lado (836) también incluye una almohadilla absorbente (840) y, preferentemente, una almohadilla de desechos (860). La primera tira reactiva (1015) incluye, preferentemente, una zona de detección (805) con una línea de prueba MxA (802), una línea de prueba de CRP baja (803) y una línea de control (804). La segunda tira reactiva (1025) incluye, preferentemente, una zona de detección (805) con una línea de prueba de CRP alta (823) y una línea de control (804). Todas las líneas de prueba son visibles a través de las ventanas (865) en el segundo lado (837) de la carcasa (835) cuando la carcasa (835) está cerrada. La almohadilla absorbente (840) es, preferentemente, una almohadilla única a la que se le añade el tampón de ejecución para iniciar el flujo lateral. De manera similar, la almohadilla de desechos (860) es, preferentemente, una almohadilla única que recoge el exceso de tampón en ejecución al final de la prueba. Sin embargo, en otros casos, cada tira podría tener una almohadilla absorbente (840) y/o una almohadilla de desechos (860) separada.

El segundo lado (837) de la carcasa (835) incluye tres secciones separadas (838), (839) y (1070). La porción media, o aleta (1070), también conocida como compresor de muestra, incluye, preferentemente, dos zonas de conjugados (872), (874), que incluye cada una un compañero de unión marcado para al menos un analito, y un control marcado. Una ventana (843) se ubica en la porción inferior (838) del segundo lado (837) de la carcasa para que pueda adicionarse el tampón cuando la carcasa (835) está cerrada. Las ventanas de visualización (865) para las zonas de detección (805) están en la porción superior (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835).

La porción superior (839) y la porción inferior (838) del segundo lado (837) de la carcasa (835) también incluyen, preferentemente, cada una al menos una perilla, clavija o protrusión (875) que coincide con uno o más orificios (895) de manera que las porciones superior e inferior (838), (839) puedan sujetarse fácilmente en el primer lado (836) de la carcasa (835). En un caso preferido, hay dos clavijas (875) en la porción inferior (838) que coinciden con dos orificios (895) que flanquean la almohadilla absorbente (840) en el primer lado (836) de la carcasa (835) y dos clavijas (875) en la porción superior (839) que coinciden con dos orificios (895) que flanquean la almohadilla de desechos (860) en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otros casos, los orificios (895) están en el segundo lado (837) de la carcasa (835) y las clavijas (875) están en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otros casos más, podrían usarse otros mecanismos de sujeción reversibles para asegurar la porción superior (838) y/o la porción inferior (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835) al primer lado (836) de la carcasa (835). En otros casos, las secciones superior e inferior (838), (839) se cierran permanentemente, por ejemplo mediante el uso de un adhesivo, antes de su uso.

La solapa (1070) en el segundo lado (837) de la carcasa incluye dos zonas de conjugados (872), (874) y puede abrirse y cerrarse fácilmente. La aleta (1070) también incluye, preferentemente, al menos una perilla, clavija o protrusión (875) que coincide con uno o más orificios (895) de manera que la aleta (1070) se cierre fácilmente y correctamente en el primer lado (836) de la carcasa (835) después de que se adicione la muestra a las zonas de aplicación de muestra (1073), (1076) en las tiras reactivas (1015), (1025). En otros casos, los orificios (895) están en el segundo lado (837)

de la carcasa (835) y las clavijas (875) están en el primer lado (836) de la carcasa (835). En otros casos más, podrían usarse otros mecanismos de sujeción reversibles para asegurar la aleta (1070) al primer lado (836) de la carcasa (835).

En algunas modalidades, las zonas de conjugado (872), (874) se colorean debido a los tintes en los conjugados de muestra y los conjugados de control. En un caso preferido, la zona de conjugado (872) que se usa para la primera tira reactiva (1015) contiene un compañero de unión de MxA que se marca con un tinte rojo, un compañero de unión de CRP baja que se marca con un tinte negro y un control el compañero de unión que se marca con un tinte azul. En este caso, la zona de conjugado (872) aparece de color violáceo. La otra zona de conjugado (874) contiene un compañero de unión con alto contenido de CRP que se marca con un tinte negro y un compañero de unión de control que se marca con un tinte azul. En este caso, la zona de conjugado (874) aparece azulada.

La zona de desvío (850), que incluye, preferentemente, un espacio o barrera, interrumpe el flujo lateral, y desvía el tampón de ejecución hacia la aleta (1070) que incluye las zonas de conjugados (872), (874).

En operación, las porciones superior e inferior (838), (839) del segundo lado (837) de la carcasa (835) se cierran, preferentemente, antes de su uso mediante el aseguramiento de las clavijas (875) a los orificios (895). El dispositivo de análisis de muestras, o tarjeta de prueba (1000), se coloca, preferentemente, sobre una superficie plana. Si la aleta (1070) aún no está abierta, el usuario la abre para acceder a las zonas de aplicación de muestra (1073), (1076). Las zonas de aplicación de muestra (1073), (1076) pueden ubicarse en cualquier porción de la plataforma de transferencia (1055). Se toma del paciente una muestra de sangre para analizarla. La muestra puede tomarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una modalidad preferida, se adiciona una muestra de 5 µl de sangre a cada una de las zonas de aplicación de muestra (1073), (1076) y después se cierra la aleta (1070). Preferentemente, cada una de las muestras de 5 µl se recoge independientemente entre sí. Preferentemente, la sangre se adiciona directamente al dispositivo (1000), sin ningún tratamiento previo. En casos preferidos, una flecha (1002) u otra indicación (mostrada en la Figura 15A), por ejemplo las palabras "adicionar muestra aquí" muestra al usuario dónde colocar la muestra en las tiras reactivas (1015), (1025).

Para garantizar que la aleta (1070) se cierre correctamente, preferentemente, se aplica presión a la carcasa (835) por encima de las clavijas (875) para cerrar las clavijas (875). La parte superior de la aleta (1070) debe estar a ras con la parte superior del resto del segundo lado (837) de la carcasa (835) para que la prueba se realice correctamente. Se adiciona un tampón de ejecución a la almohadilla absorbente (840), que inicia el flujo lateral (885). En casos preferidos, el tampón de ejecución incluye uno o más agentes de lisis, por ejemplo detergentes, para lisar la muestra de sangre y exponer la MxA intracelular en la muestra. Cuando el tampón de ejecución llega a la zona de desvío (850), se desvía hacia la aleta (1070). Viaja a través de las zonas de conjugado (872), (874), recoge los compañeros de unión de MxA, los compañeros de unión de CRP baja y los compañeros de unión de CRP alta, así como también el conjugado de control.

Dado que las zonas de conjugado (872), (874) unen la zona de desvío (850) en las tiras de prueba de flujo lateral (1015), (1025), el tampón de ejecución, que ahora contiene conjugado, después viaja hacia la plataforma de transferencia (1055), que incluye las zonas de aplicación de muestra (1073), (1076), y las zonas de detección (805) en cada una de las tiras reactivas (1015), (1025). Si MxA está presente en la muestra, la línea de prueba de MxA (802) en la primera tira reactiva (1015) será roja. Si en la muestra hay un nivel umbral bajo de proteína C reactiva, la línea de prueba de CRP baja (803) en la primera tira reactiva (1015) será negra. Si en la muestra hay un nivel umbral alto de proteína C reactiva, la línea de prueba de CRP alta (823) en la segunda tira reactiva (1025) será negra. En casos preferidos, los niveles de detección son 40 ng/ml para MxA, 10 mg/l para CRP baja en la primera tira reactiva (1015) y 80 mg/l para CRP alta en la segunda tira reactiva (1025). En otros casos preferidos, los niveles de detección son 25 ng/ml para MxA, 20 mg/l para CRP baja en la primera tira reactiva (1015) y 80 mg/l para CRP alta en la segunda tira reactiva (1025). Podría usarse cualquier combinación de estos diferentes valores de corte. Los resultados de la prueba deberían ser visibles después de aproximadamente 5-20 minutos, preferentemente, dentro de aproximadamente 10 minutos. Si la prueba se realizó correctamente, las líneas de control (804) tanto en la primera tira reactiva (1015) como en la segunda tira reactiva (1025) serán azules.

Dado que el compañero de unión de control está en la aleta (1070) y no en ninguna de las tiras reactivas (1015), (1025), existe un verdadero control de procedimiento para esta configuración. Si la aleta (1070) no se cierra correctamente, no aparecerá nada en la zona de detección (805), lo que indica que la prueba se realizó incorrectamente.

En una descripción alternativa, las zonas de aplicación de muestra (1073), (1076) se ubican en la plataforma receptora (845), antes de la zona de desvío (850). En este caso, el tampón de ejecución viaja a través de las zonas de aplicación de muestra (1073), (1076) y después se desvía hacia la aleta (1070).

En los casos preferidos de las configuraciones mostradas en las Figuras 13A a 13C y 15A a 15C, se colocan más de aproximadamente 1,2 ml de tampón de ejecución sobre la almohadilla absorbente (840). Si se adiciona menos de 1,0 ml en modalidades en las que la zona de desvío (850) es un espacio, el tampón se detiene en el espacio porque el espacio contiene aproximadamente 1,0 ml.

Como se muestra en la Figura 16, un kit (1100) incluye el dispositivo de análisis de muestras (800), (1000), una lanceta (1102), una o más pipetas (1101) y un tampón de ejecución (1103). La lanceta (1102) se usa para realizar una punción en la piel y una o más pipetas (1101) se usan para recoger la sangre del sitio de punción. En un ejemplo, se transfieren 5 µl de sangre desde una primera pipeta (1101) a la primera zona de conjugado (872, ver las Figuras 13B y 15B) y se transfieren otros 5 µl de sangre desde una segunda pipeta (1101) y se adicionan a la segunda zona de conjugado (874, ver las Figuras 13B y 15B). Se cierra la aleta (870) y se adiciona el tampón de ejecución (1103) a la almohadilla absorbente (840), como se describe en la descripción de las Figuras 13A a 13C y 15A a 15C.

La zona de desviación (850) incluye, preferentemente, al menos una característica que interrumpe el flujo en el plano en el que se produce el flujo. La zona de desvío puede incluir una barrera, un espacio, una zanja o cualquier combinación de estas características. La barrera es, preferentemente, una membrana impermeable (o membrana sustancialmente impermeable) que puede estar fabricada de cualquier material que impida que el flujo de líquido continúe el movimiento en el mismo plano. Algunos materiales para la barrera incluyen, pero no se limitan a, materiales inertes, materiales semipermeables, plásticos, hidrocarburos, metales, materiales hidrófobos, sefadex, sefarosa, acetato de celulosa, un material higroscópico (por ejemplo  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaSO}_4$  o gel de sílice), o hidrogeles. La brecha o zanja es cualquier ruptura en el plano de la tira de prueba de flujo lateral que se extiende hasta una profundidad suficiente para detener el flujo. En un caso preferido, la ranura tiene, preferentemente, al menos aproximadamente 0,1 mm de profundidad.

La zona de desviación (850) en las Figuras 13A a 13C y 15A a 15C retrasa o detiene completamente el flujo hasta que el compresor/aleta de muestra (870), (1070) se pone en contacto con el resto del dispositivo, y crea un puente a lo largo del cual el fluido puede fluir. El compresor de muestra (870), (1070) actúa como un puente y redirige el flujo a un plano diferente. El flujo se desvía al compresor de muestra (870), (1070). Esto aumenta la recolección de los reactivos en el compresor de muestra (870), (1070). Por ejemplo, cuando el conjugado está en el compresor de muestra (870), (1070), la recolección del conjugado aumenta en dispositivos con una zona de desviación (850). Cuando tanto las zonas de aplicación de muestra (873), (876), (1073), (1076) como el conjugado están en el compresor de muestra (870), (1070), tanto la muestra como el conjugado encuentran el tampón de ejecución cuando se desvía en el compresor de muestra (870), (1070), y se forma  $\frac{1}{2}$  sándwich o sándwich completo (en dependencia de dónde se encuentre el segundo compañero de unión para el analito en el dispositivo de análisis de muestra) antes de que el tampón en ejecución se desvíe nuevamente a las tiras de prueba si el analito está presente en la muestra. Los dispositivos con una zona de desviación (850) y un compresor de muestra (870), (1070) aumentan la velocidad, permiten mejores interacciones entre el conjugado y la muestra y permiten una mayor sensibilidad porque se coloca más conjugado en el fluido. En estos, todo el fluido interactúa, preferentemente, con el conjugado. Esta es una mejora significativa con respecto a los compresores sin redirección, donde aproximadamente 20-30 % del fluido interactúa con el conjugado.

Otra configuración preferida para un dispositivo de análisis de muestras de tira reactiva dual bimodal (1200) se muestra en la Figura 17. Esta configuración es similar a las configuraciones (800), (1000) mostradas en las Figuras 13A a 13C y en las Figuras 15A a 15C, sin una segunda sección (837) de la carcasa (1235) o una zona de desvío (850). En cambio, todos los componentes de la prueba se ubican en el mismo plano y el flujo avanza lateralmente desde la almohadilla absorbente (840) hasta la almohadilla de desechos (860). Tenga en cuenta que esto también podría incluir una carcasa con una ventana para facilitar la aplicación del tampón a la almohadilla absorbente (840), una ventana ubicada encima de cada zona de aplicación de muestra (1273), (1276) para aplicar la muestra al dispositivo (1200), y ventanas de visualización para la zona de detección (805). En un caso preferido, el dispositivo de análisis de muestras (1200) mide aproximadamente 11,5 cm de largo (L) x 7 cm de ancho (W). Sin embargo, puede usarse una tarjeta de prueba de cualquier tamaño (1200) que se adapte a todos los componentes. Hay dos tiras reactivas (1215), (1225), cada una de las cuales incluye una almohadilla receptora (845), una zona de conjugado (1272), (1274), una almohadilla de transferencia (1255) que contiene una zona de aplicación de muestra (1273), (1276), una zona de detección (805) y una almohadilla de desechos (860). Si bien las zonas de conjugados (1272), (1274) se muestran aguas arriba de las zonas de aplicación de muestra (1273), (1276) en esta figura, una o ambas de las zonas de conjugados (1272), (1274) pueden ubicarse aguas abajo de las zonas de aplicación de muestra (1273), (1276). La zona de detección (805) de la primera tira reactiva (1215) incluye, preferentemente, una línea de prueba de MxA (802), una línea de prueba de CRP baja (803) y una línea de control (804). La zona de detección (805) en la segunda tira reactiva (1225) también incluye, preferentemente, una línea de prueba de CRP alta (823) y una línea de control (804). La almohadilla absorbente (840) es, preferentemente, una almohadilla única a la que se adiciona el tampón de ejecución para iniciar el flujo lateral. De manera similar, la almohadilla de desechos (860) es, preferentemente, una almohadilla única que recoge el exceso de tampón en ejecución al final de la prueba. Sin embargo, en otros casos, cada tira podría tener una almohadilla absorbente (840) y/o una almohadilla de desechos (860) separada.

En casos preferidos, las zonas de conjugado (1272), (1274) se colorean debido a los tintes en los conjugados de muestra y los conjugados de control. En un caso preferido, la zona de conjugado (1272) que se usa para la primera tira reactiva (1215) contiene un compañero de unión de MxA que se marca con un tinte rojo, un compañero de unión de CRP baja que se marca con un tinte negro y un compañero de unión de control que se marca con un tinte azul. En este caso, la zona de conjugado (1272) aparece violácea. La otra zona de conjugado (1274) contiene un compañero de unión con alto contenido de CRP que se marca con un tinte negro y un compañero de unión de control que se marca con un tinte azul. En este caso, la zona de conjugado (1274) aparece azulada.

Durante el funcionamiento, se toma del paciente una muestra de sangre para analizarla. La muestra puede tomarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En un caso preferido, se adiciona una muestra de 5 µl de sangre a cada una de las zonas de aplicación de muestra (1273), (1276). Preferentemente, cada una de las muestras de 5 µl se recoge independientemente entre sí. En el caso preferido, una flecha (1002) u otra indicación (mostrada en la Figura 15A), por ejemplo las palabras "adicionar muestra aquí" muestra al usuario dónde colocar la muestra en las tiras reactivas (1215), (1225).

Preferentemente, la sangre se adiciona directamente al dispositivo (1200), sin ningún tratamiento previo. Se adiciona tampón de ejecución a la almohadilla absorbente (840), que inicia el flujo lateral (1285). En casos preferidos, el tampón de ejecución incluye uno o más agentes de lisis, por ejemplo detergentes, para lisar la muestra de sangre y exponer la MxA intracelular en la muestra. Viaja a través de las zonas de conjugado (1272), (1274), recoge los compañeros de unión de MxA, los compañeros de unión de CRP baja, los compañeros de unión de CRP alta, así como también el conjugado de control. En algunos casos preferidos, los agentes de lisis NP-40 y sarcosilo se incluyen en un tampón de ejecución que contiene Tris.

El tampón de ejecución, que ahora contiene el conjugado, después viaja a la plataforma de transferencia (1255), que incluye las zonas de aplicación de muestra (1273), (1276) y a las zonas de detección (805) en cada una de las tiras reactivas (1215), (1225). Si MxA está presente en la muestra, la línea de prueba de MxA (802) en la primera tira reactiva (1215) será roja. Si en la muestra hay un nivel umbral bajo de proteína C reactiva, la línea de prueba de CRP baja (803) en la primera tira reactiva (1215) será negra. Si en la muestra hay un nivel umbral alto de proteína C reactiva, la línea de prueba de CRP alta (823) en la segunda tira reactiva (1225) será negra. En modalidades preferidas, los niveles de detección son 40 ng/ml para MxA, 10 mg/l para CRP baja en la primera tira reactiva (1215) y 80 mg/l para CRP alta en la segunda tira reactiva (1225). Los resultados de la prueba deberían ser visibles después de aproximadamente 5-20 minutos, preferentemente, dentro de aproximadamente 10 minutos. Si la prueba se realizó correctamente, las líneas de control (804) tanto en la primera tira (1215) como en la segunda tira reactiva (1225) serán azules.

En una descripción alternativa, las zonas de aplicación de muestra (1273), (1276) se ubican aguas arriba de las zonas de conjugado (1272), (1274). En esta modalidad, el tampón de ejecución viaja a través de las zonas de aplicación de muestra (1273), (1276) y después a las zonas de conjugado (1272), (1274). En otros casos más, las zonas de conjugado (1272), (1274) se solapan a las zonas de aplicación de muestra (1273), (1276). En otros casos más, las zonas de conjugado (1272), (1274) y/o las zonas de aplicación de muestra (1273), (1276) pueden ubicarse en la plataforma receptora (845).

En los ejemplos preferidos de las configuraciones mostradas en las Figuras 9A a 13C, 15A a 15C y 17, el control es anti pollo de conejo y el conjugado de control son perlas de látex azul acopladas a IgY de pollo. En otros casos preferidos, en el tampón de ejecución se encuentra al menos un agente de lisis, preferentemente, un detergente. En algunos casos preferidos, los agentes de lisis NP-40 y sarcosilo se incluyen en un tampón de ejecución que contiene Tris.

Las tiras reactivas bimodales con reactivos para detectar MxA y proteína C reactiva se diseñaron para detectar una respuesta inmune del hospedero (únicamente), no antígenos virales o bacterianos específicos, ácidos nucleicos (que incluyen el desprendimiento de ADN viral) o crecimiento de cultivos de células bacterianas. Si estas tiras reactivas dan negativo, se produce una enfermedad respiratoria no confirmada microbiológicamente.

La prueba bimodal de doble tira permite la detección in vitro rápida, visual y cualitativa de MxA y de la proteína C reactiva directamente a partir de sangre entera periférica. La prueba mide una respuesta inmune clínicamente significativa a una sospecha de infección viral y/o bacteriana invasiva en pacientes mayores de 1 año que se presentan dentro de los 3 días posteriores a una fiebre de inicio agudo y dentro de los 7 días posteriores a la aparición de síntomas respiratorios consistentes con una sospecha de infección de las vías respiratorias superiores adquirida de la comunidad (rinofaringitis, faringoamigdalitis, laringotraqueítis) o infección de las vías respiratorias inferiores (traqueobronquitis, bronquiolitis o neumonía). La prueba bimodal de doble tira ayuda a identificar 1) pacientes con una infección viral invasiva subyacente de Influenza A/B, Adenovirus, Virus sincitial respiratorio, Metapneumovirus, virus de Parainfluenza o virus de Epstein-Barr; 2) pacientes con una respuesta elevada del hospedero clínicamente significativa consistente con una infección bacteriana subyacente.

La prueba se destina a uso profesional en un entorno ambulatorio y debe usarse junto con otra evidencia clínica, que incluye información de laboratorio, radiográfica y epidemiológica.

Los resultados negativos no excluyen la infección respiratoria y no deben usarse como única base para el diagnóstico, el tratamiento u otras decisiones clínicas y de manejo del paciente. En adición a utilizar la radiografía y presentación clínica para ayudar en el diagnóstico, deben usarse pruebas de laboratorio adicionales (por ejemplo, cultivo bacteriano y viral, inmunofluorescencia y reacción en cadena de la polimerasa viral) para confirmar si existe un patógeno respiratorio específico.

Para aclarar el diagnóstico, en modalidades preferidas, las tiras reactivas bimodales descritas en las Figuras 13-17 (o uno o más métodos y dispositivos de ensayo alternativos capaces de detectar con exactitud niveles de MxA, CRP baja y CRP alta en ciertos umbrales, como se define en la presente descripción), se usan en combinación con un dispositivo de análisis de muestras independiente que analiza la presencia de procalcitonina. Por ejemplo, puede determinarse un nivel de procalcitonina en los pacientes con los resultados mostrados en la Figura 14A, donde los resultados de MxA y proteína C reactiva son todos negativos y el diagnóstico del paciente no se confirma microbiológicamente. En casos alternativos, se toman los valores de procalcitonina en lugar de los valores de proteína C reactiva. La determinación diagnóstica de URI e LRTI mediante el uso de procalcitonina y otros métodos para pacientes microbiológicamente no confirmados que se muestran en las Figuras 3 y 4 aclararía el diagnóstico de estos pacientes. Como ejemplo, un nivel de procalcitonina igual o superior a aproximadamente 0,15 ng/ml crea una presunción de que el paciente tiene una infección bacteriana. En pacientes con infecciones de las vías respiratorias inferiores sin infiltrado no confirmadas microbiológicamente, un nivel de procalcitonina inferior a 0,15 ng/ml crea una presunción de que el paciente no es infeccioso. La combinación de resultados crea un diagnóstico más exacto para los pacientes.

Algunos ejemplos de formatos de ensayo para determinar la presencia de procalcitonina incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos, métodos de inmunotransferencia, reacciones de aglutinación, una reacción de fijación del complemento, una reacción hemolítica, una reacción de precipitación, un método de coloide de oro, un método de cromatografía, fosforescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X, absorción de rayos X, magnetismo, emisiones resonantes fluorescentes o un método de inmunotinción. Algunos ejemplos de inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación, radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA o ELISA), dispositivo de inmunoensayo Vidas® (Biomérieux, Hazelwood, Missouri), inmunoensayos fluorescentes (FIA), inmunoensayos quimioluminiscentes, ensayos físicoquímicos (TIA, LAPIA o PCIA), inmunoensayos de flujo lateral o citometría de flujo. Algunos inmunoensayos preferidos para estos biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, ELISA, inmunoensayos de fluorescencia y ensayos quimioluminiscentes. En algunos casos preferidos, los ensayos se automatizan.

MxA impulsa una mayor especificidad y aumenta la sensibilidad de los biomarcadores bacterianos

Diversas infecciones virales tales como la influenza A/B, adenovirus y virus de Epstein-Barr, provocan elevaciones de leves a moderadas en la respuesta de fase aguda, lo que lleva a elevaciones tanto de la proteína C reactiva (CRP) como de la procalcitonina (PCT). Históricamente, la proteína C reactiva y la procalcitonina se usaron independientemente en un esfuerzo por distinguir las enfermedades de origen viral de las de etiología bacteriana. En concentraciones más bajas, la proteína C reactiva tiene una alta sensibilidad pero una especificidad muy baja para una infección bacteriana y en concentraciones muy altas ocurre lo contrario y la sensibilidad es pobre pero la especificidad mejora significativamente. En Escandinavia, las pruebas de proteína C reactiva en el lugar de atención son parte de la evaluación de rutina de pacientes con infecciones respiratorias en la práctica general, y su uso demostró ser rentable, a pesar del importante solapamiento de los signos y síntomas virales y bacterianos a niveles moderados de proteína C reactiva. En la práctica general, se descubrió que la proteína C reactiva es una ayuda valiosa para reducir el uso de antibióticos innecesarios, incluso si tiene un valor modesto para diferenciar enfermedades virales de bacterias independientemente.

Al igual que la proteína C reactiva, en concentraciones bajas, la procalcitonina tiene una alta sensibilidad y una baja especificidad para diferenciar una infección viral de una bacteriana, pero en concentraciones altas ocurre lo contrario: la sensibilidad disminuye y la especificidad aumenta.

Si bien los biomarcadores del hospedero de infección bacteriana, la proteína C reactiva y la procalcitonina son marcadores bacterianos usados en la técnica, conocidos por su falta de sensibilidad y especificidad cuando se usan solos. MxA es un biomarcador específico de infección viral. El solicitante descubrió que las pruebas de presencia de MxA, un biomarcador de infección viral del hospedero, combinado con proteína C reactiva o procalcitonina crea una sinergia inesperada, mayor que un fenómeno aditivo, y aumenta tanto la especificidad como la sensibilidad de ambos marcadores bacterianos. Típicamente, un biomarcador bacteriano tiene la capacidad de detectar una infección bacteriana con un punto optimizado que maximiza la sensibilidad y la especificidad para identificar una infección bacteriana. La presencia de MxA permite que la curva cambie a la máxima sensibilidad (una concentración de corte de procalcitonina o proteína C reactiva más baja) sin sacrificar la especificidad porque MxA identifica a los pacientes virales que tienen proteína C reactiva o procalcitonina elevada (lo que lleva a una especificidad reducida), y recategoriza correctamente a estos pacientes como virales. Por lo tanto, cualquier paciente con una proteína C reactiva o procalcitonina elevada en presencia de MxA tiene una enfermedad viral y cualquier elevación de la proteína C reactiva o procalcitonina (ahora a una concentración de corte mucho más baja) en ausencia de MxA es bacteriana. Además, la falta de elevación de la proteína C reactiva, procalcitonina, o MxA tiene un valor predictivo negativo extremadamente alto para la presencia de una infección clínicamente significativa. Alternativamente, pueden usarse otros biomarcadores de infección viral del hospedero, por ejemplo IFIT (proteínas inducidas por interferón con repeticiones tetratricopeptídicas) para aumentar la sensibilidad y especificidad de cualquiera de los biomarcadores bacterianos probados solos.

En una curva receptor-operador hay un punto de optimización de especificidad y uno de sensibilidad para la detección de cada biomarcador. El uso de MxA como segundo biomarcador en combinación aumenta la especificidad tanto de



la procalcitonina como de la proteína C reactiva y también cambia sus curvas para permitir una mayor sensibilidad optimizada. En la Figura 22 se muestra una curva receptor-operador de proteína C reactiva y en la Figura 23 una curva receptor-operador de procalcitonina. Las sensibilidades y especificidades para la proteína C reactiva de varios estudios (y las referencias respectivas) se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Valor de corte de CRP	Sensibilidad	Especificidad	Artículo
20 mg/l	100 %	75 %	Putto A, Ruuskanen O, Meurman O. Arch Dis Child. Enero de 1986; 61(1):24-9.
20 mg/l	100 %	54 %	Hatherill M, Tibby SM, Sykes K y otros. Arch Dis Child 1999; 81: 417-21.
20 mg/l	83 %	67 %	Berger RM, Berger MY, van Steensel-Moll HA, Eur J Pediatr 1996; 155: 468-73.
40 mg/l	76 %	60 %	Lala S, Madhi S, Pettifor J. Ann Trop Pediatr. 2002; 22: 271-279.
40 mg/l	71 %	81 %	Andreola G, Bressan S, Callegaro S. Pediatr Infect Dis J 2007; (8): 672-7.
40 mg/l	83 %	88 %	Liu A, Bui T, Van Nguyen H. Age Ageing 2010: 559-65.
50 mg/l	94 %	72 %	Stolz, D, Christ-Crain M, Gencey MM y otros. Swiss Med Wkly. 2006;136(27-28):434-440.
60mg/l	81 %	96 %	Liu A, Bui T, Van Nguyen H. Age Ageing 2010: 559-65.
60mg/l	70 %	52 %	Moulin F, Raymond J, Lorrot M y otros, Arch Dis Child. 2001; 84: 332-336.
80 mg/l	72 %	97 %	Liu A, Bui T, Van Nguyen H. Age Ageing 2010: 559-65.
80 mg/l	15 %	95 %	Korppi M, Kroger L. Scand J Infect Dis J 1992; 207-213.
80 mg/l	46 %	95 %	Andreola G, Bressan S, Callegaro S. Pediatr Infect Dis J 2007; (8): 672-7.

Como se muestra en la Figura 22, el valor ROC optimizado de la proteína C reactiva sola es 40 mg/l (74 % de sensibilidad y 73 % de especificidad). La prueba de una combinación de 20 mg/l de proteína C reactiva y 40 ng/ml de MxA aumenta la sensibilidad y la especificidad al 95 % y 90 %, respectivamente. La prueba de una combinación de 40 mg/l de proteína C reactiva y 40 ng/ml de MxA (no se muestra en las figuras) aumenta la sensibilidad y la especificidad al 100 % y al 90 %, respectivamente. Por lo tanto, el uso de MxA en combinación con proteína C reactiva permite una interpretación más exacta con la detección de niveles más bajos de proteína C reactiva y confía en MxA para proporcionar la especificidad.

Como se muestra en la Figura 23, la ROC optimizada de la procalcitonina sola es de 0,4 ng/ml (95 % de sensibilidad y 57 % de especificidad). La prueba de una combinación de 0,4 ng/ml de procalcitonina y 40 ng/ml de MxA aumenta la sensibilidad y la especificidad a 100 % y 90 %, respectivamente. Por tanto, una combinación de MxA y procalcitonina permite no solo una mayor sensibilidad sino también un aumento espectacular de la especificidad.

La interpretación de la enfermedad basada únicamente en C reactiva o procalcitonina (u otros biomarcadores bacterianos del hospedero) obtenidas por cualquier medio mejora significativamente en el contexto de los niveles de MxA. Puede obtenerse un resultado de prueba de proteína C reactiva o de procalcitonina de una prueba y adicionar niveles de MxA (obtenidos de la misma prueba o de una prueba diferente por cualquier medio) mejora las características clínicas tales como sensibilidad y especificidad.

Como se definió anteriormente, una infección clínicamente significativa es la confirmación microbiológica local de un patógeno mediante cultivo celular, técnicas moleculares y antígeno en asociación con una respuesta inmune sistémica (proteína C reactiva, procalcitonina, MxA o respuesta serológica).

El solicitante también descubrió que un resultado positivo de proteína C reactiva baja más un resultado positivo de MxA no indica una coinfección viral-bacteriana. En cambio, un paciente con ese resultado solo tiene una infección viral. De hecho, el solicitante cree que la coinfección viral-bacteriana existe solo con poca frecuencia. Las verdaderas infecciones son únicamente bacterianas o únicamente virales. Un diagnóstico de "coinfección" es producto de definiciones erróneas de infección. La presencia de una infección verdadera (frente a la colonización de un virus o una bacteria) requiere tanto la presencia de un patógeno como una respuesta del hospedero (respuesta sistémica) a esa infección. En los métodos de la técnica anterior, los técnicos y médicos cultivaban una muestra e ignoraban si había o no presencia simultánea de una respuesta del hospedero. Cuando vieron crecer juntos un cultivo bacteriano y viral, lo definirían como coinfección. En un estudio de más de 300 pacientes, el solicitante no observó casos de coinfección en sus pacientes. La proteína C reactiva baja y la MxA elevada eran en realidad solo infecciones virales.

Una prueba rápida de flujo lateral ayuda a los médicos de atención primaria y de urgencia en el ámbito ambulatorio a realizar una evaluación rápida de la importancia clínica de una infección respiratoria aguda. Además, la prueba ayuda a diferenciar las infecciones con una respuesta sistémica del hospedero de las infecciones locales o la colonización, así como también a identificar a los pacientes con una infección viral o bacteriana versus aquellos con una enfermedad respiratoria microbiológicamente no confirmada (MU). La prueba usa una combinación de dos biomarcadores, que incluyen la proteína A de resistencia a mixovirus (MxA), un nuevo biomarcador viral, y la proteína C reactiva (CRP). MxA es una proteína sanguínea intracelular inducida por interferón tipo 1 y, por lo tanto, es específica de infecciones virales verdaderas (a diferencia del transporte viral). El biomarcador normalmente está muy bajo en la sangre, pero se induce rápidamente en caso de una infección viral, tiene una vida media larga y permanece elevado en presencia de niveles elevados de interferón.

La prueba es, preferentemente, una prueba desechable de un solo uso que usa una muestra de sangre por punción digital (5 µl) cerca de la cama. El tiempo para obtener el resultado es de aproximadamente 15 minutos y no se requiere procesamiento adicional de la muestra. La lectura de la prueba se interpreta como una infección viral cuando la MxA está elevada (MxA positiva, proteína C reactiva positiva o negativa) o como una infección bacteriana cuando la proteína C reactiva está elevada en presencia de MxA normal (MxA negativa, proteína C reactiva baja o alta positiva).

Los formatos de tiras dobles para una prueba de flujo lateral que detecta la presencia de MxA y proteína C reactiva se muestran en las Figuras 13A-13C y 15A-15C, y se describen en patente de EE. UU. núm. 8,962,260, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections", publicada el 24 de febrero de 2015, y publicación de patente de EE. UU. núm. 2013/0196310, titulada "Method and Device for Combined Detection of Viral and Bacterial Infections", publicada el 1 de agosto de 2013, ambas incorporadas en la presente descripción como referencia.

En los datos de un ensayo clínico multicéntrico prospectivo realizado en los EE. UU. que usó el formato que se muestra en las Figuras 13A a 13C, la prueba de flujo lateral demostró una sensibilidad y especificidad del 80 % y 96 %, respectivamente, para identificar una infección bacteriana, y una sensibilidad y especificidad del 86 % y 94 %, respectivamente, para detectar una infección viral. Los pacientes de este estudio con proteína C reactiva positiva (CRP baja y/o alta) y MxA positiva se identificaron como portadores de una infección viral. Para cinco pacientes, las líneas de prueba para CRP baja, CRP alta y MxA fueron todas positivas, y se identificó que todos estos pacientes tenían una infección viral. Los resultados "no confirmados" se interpretan, preferentemente, como "negativos".

Alternativamente, la prueba puede tener un formato aún más simple con una sola tira que incluya MxA y proteína C reactiva (preferentemente, CRP baja).

En modalidades alternativas, MxA es el biomarcador viral del hospedero y el biomarcador bacteriano del hospedero es procalcitonina.

IFIT como biomarcadores virales del hospedero

Si bien MxA se describió predominantemente en la presente descripción como biomarcador viral del hospedero, pueden usarse biomarcadores virales alternativos del hospedero en combinación con procalcitonina y/o proteína C reactiva para diagnosticar efectivamente la infección. Como ejemplo, las proteínas inducidas por interferón con repeticiones tetratricopeptídicas (IFIT), que se expresan en respuesta a una infección viral, pueden usarse como marcador de infección viral. Los IFIT podrían analizarse en lugar de MxA mediante el uso de flujo lateral (por ejemplo, cualquiera de los dispositivos de flujo lateral descritos en la presente descripción) o cualquier otro dispositivo de ensayo conocido en la técnica.

Ejemplo 1

Un estudio evaluó la exactitud de un inmunoensayo en el lugar de atención para identificar una respuesta inmune a una infección viral y/o bacteriana en pacientes que presentan sospecha de faringitis o infección de las vías respiratorias inferiores (LRTI) en comparación con pruebas confirmatorias microbiológicas, radiológicas y de laboratorio.

Entre diciembre de 2012 y agosto de 2013 se realizó un ensayo de viabilidad clínica con enmascaramiento, prospectivo, de un solo centro, en el Beth Israel Deaconess Medical Center, un hospital docente de atención terciaria de la Facultad de Medicina de Harvard. Se inscribieron sesenta sujetos con infección respiratoria febril aguda. Diecinueve tenían faringitis y 41 tenían LRTI. Se consideraron elegibles para el estudio todos los sujetos mayores de 17 años que presentaran síntomas respiratorios agudos compatibles con infección, que tuvieran fiebre, o que reportaran tener fiebre superior o igual a 100,5 en las últimas 48 horas. En el momento de la inscripción, los 36 sujetos del caso se separaron en 12 con presunta faringitis y 24 con presunta LRTI. Si un paciente no tenía fiebre y estaba asintomático (como se describe en los criterios de inclusión), se consideró al paciente para su inclusión como sujeto de control. Se inscribieron veinticuatro pacientes en el grupo de control.

A los pacientes calificados con un diagnóstico clínico de faringitis o LRTI se les recogieron las siguientes muestras: se aplicó una muestra de sangre por punción digital a un inmunoensayo rápido en el lugar de atención (que analiza MxA y proteína C reactiva; ver los ensayos descritos anteriormente en las Figuras 13-17), seguido de la recogida de cuatro

muestras orofaríngeas, una muestra de sangre venosa y una muestra de orina. Se enviaron dos muestras orofaríngeas para pruebas de PCR viral y dos muestras orofaríngeas para cultivo celular bacteriano de rutina. Una muestra de sangre venosa midió los niveles de proteína C reactiva y MxA con un ELISA y las bacterias atípicas se confirmaron con pruebas serológicas emparejadas. A los pacientes con sospecha de LRTI se les midieron cultivos de esputo, radiografías de tórax y recuento de WBC. Fue necesaria una visita de seguimiento 4-6 semanas después de la primera visita para recolectar una muestra de sangre venosa para pruebas serológicas de seguimiento. El personal que realizó el inmunoensayo no conocía los resultados de las pruebas confirmatorias.

Se confirmó una infección viral si la prueba de PCR orofaríngea fue positiva para patógenos virales. Se confirmó una infección bacteriana cuando los cultivos de garganta identificaron un crecimiento de estreptococo beta hemolítico del grupo A u otro crecimiento bacteriano superior a  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU)/ml. Si el ensayo de antígeno en orina de *Streptococcus pneumoniae* o *Legionella* fue positivo, confirmó una infección bacteriana. La infección bacteriana se confirmó mediante cultivos positivos de garganta o esputo. Los anticuerpos IgM elevados o el aumento del doble en los anticuerpos IgG entre la fase aguda y la de convalecencia indicaron bacterias atípicas. Los análisis positivos de antígenos en orina de *Streptococcus* o *Legionella* también confirmaron la infección bacteriana.

El inmunoensayo se interpretó mediante la identificación de la presencia de las líneas de control o líneas de resultados de acuerdo con la Tabla 10 y las Figuras 14A a la Figura 14F.

Tabla 10

Cont	MxA	CRP	CRP	Resultado de la prueba
+	+			Infección viral
+	+	+		Infección viral*
+	+	+	+	Coinfección/bacteriana
+		+		Coinfección/bacteriana
+		+	+	Coinfección/bacteriana
+				Negativo
				Inválido
*no puede impedir la coinfección				

La presencia de dos líneas de control (azul) y una línea MxA (roja) indica infección viral. La presencia de dos líneas de control, una línea MxA y una línea de CRP baja (negra) indica una infección viral, pero no excluye la coinfección. La presencia únicamente de líneas de control indica un resultado negativo. La presencia de dos líneas de control y una línea de CRP baja indica una infección bacteriana. La presencia de dos líneas de control, una línea de CRP baja y una línea de PCR alta (negra) indica una infección bacteriana. La presencia de dos líneas de control, una línea MxA, una línea de CRP baja y una línea de CRP alta indica una infección bacteriana o coinfección. Ninguna línea de control indica una prueba no válida.

Dos de las muestras orofaríngeas se enviaron para un panel de PCR respiratoria viral (Luminex xTAG; Austin, TX) y otras pruebas de PCR viral, mientras que las otras dos muestras orofaríngeas se enviaron para un cultivo celular bacteriano de rutina. Se envió una muestra de sangre venosa periférica de 5 ml, recogida en un tubo con tapa de color púrpura (ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]), para pruebas cuantitativas de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) de MxA mediante el uso del kit de prueba MxA Protein ELISA (Kyowa Medex Co., Ltd.; Tokio, Japón) y medición de WBC. Se usó una segunda muestra, recogida en un tubo con tapa roja, para la prueba de proteína C reactiva con el kit de prueba de inmunoensayo enzimático de proteína C reactiva de alta sensibilidad (Biocheck, Inc.; Foster City, CA).

El diagnóstico de *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* se determinó mediante PCR y se realizó por medio de serología emparejada en el momento de la inscripción y entre 4-6 semanas después. Se usaron pruebas ELISA disponibles comercialmente (Ani Labsystems Ltd. Oy.; Vantaa, Finlandia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la detección de anticuerpos inmunoglobulina M (IgM) e IgG contra *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*. La infección bacteriana atípica se confirmó si había identificación de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* mediante PCR, la presencia de anticuerpos IgM para *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, o un aumento del doble en los anticuerpos IgG entre las muestras de fase aguda y de convalecencia.

Se consideró una infección bacteriana típica definitiva cuando se cultivó una bacteria a partir de sangre, esputo o si el ensayo de antígeno en orina para *Legionella* o *Streptococcus* resultó positivo. A todos los sujetos sospechosos de LRTI se les extrajo sangre venosa periférica y se les envió para cultivos de sangre bacterianos de rutina. Al llegar al laboratorio clínico, las muestras se dividieron en muestras para sembrar en agar sangre y chocolate. Todas las muestras se procesaron dentro de las 24 horas posteriores a la recogida y una sola unidad formadora de colonias (CFU)/ml de una sola especie bacteriana indicó una infección y no una colonización.

Se recogió esputo expectorado de sujetos con tos productiva y presunta LRTI. Cada muestra de esputo se evaluó de acuerdo con el esquema de clasificación de Miller (Miller, A study of techniques for the examination of sputum in a field survey of chronic bronchitis. Am Rev Respir Dis. 1963;88:473-483). De acuerdo con los criterios de Murray &

Washington (Murray y otros, Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. Mayo Clin Proc. 1975;50(6):339-344), solo se sembraron para cultivo muestras que tenían más de 25 leucocitos polimorfonucleares y menos de 25 células escamosas por campo de alta potencia del microscopio. La calidad de las muestras de esputo se evaluó mediante la evaluación del número de células inflamatorias y epiteliales. Se consideró infección bacteriana definitiva cuando se produjo cualquier crecimiento de estreptococo beta hemolítico del grupo A o cualquier otro crecimiento bacteriano superior a  $1 \times 10^5$  CFU/ml de muestras orofaríngeas o muestras de esputo.

Se recogieron muestras de orina y se analizaron para detectar antígenos de *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila*. Se realizaron pruebas de membrana inmunocromatográfica (Alere BinaxNOW S. pneumoniae y BinaxNOW Legionella; Waltham, MA) en muestras de orina para la detección de antígenos de *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila*. La identificación de *Legionella pneumophila* mediante PCR también confirmó el diagnóstico de *Legionella*.

Se confirmó una infección viral definitiva si el panel respiratorio de PCR orofaríngeo (Luminex xTAG; Austin, TX) u otra PCR viral fue positiva para ácido nucleico viral.

Los sujetos que no tenían confirmación microbiológica definitiva de la enfermedad se caracterizaron de acuerdo con los métodos mostrados en las Figuras 18 y 19, que se describieron de manera más general anteriormente. Se usaron niveles elevados de proteína C reactiva para determinar la infección bacteriana en pacientes inicialmente sin confirmación microbiológica de infección.

Se produjeron dos pruebas no válidas y cuatro sujetos tuvieron diagnóstico indeterminado. De los 54 pacientes restantes, el inmunoensayo identificó correctamente un total combinado de 92 % (22/24) de los pacientes negativos para infección, 85 % (17/20) de infecciones bacterianas y 70 % (7/10) de infecciones virales. El por ciento de concordancia negativa y positiva de la prueba se calculó de acuerdo con los gráficos de las Tablas 11A-11C.

Tabla 11A

Faringitis N = 19	Comparador (Evaluación microbiológica, radiológica, de laboratorio)				
		Bacteriana o co infección	Viral	Negativo	% Correcto
Inmunoensayo de doble tira biomodal (para MxA, CRP baja y CRP alta)	Bacteriana o co infección	5	1	0	100 % (5/5)
	Viral		3	0	75 % (3/4)
	Negativo	0	0	7	100 % (7/7)
	Total	5	4	7	

Tabla 11B

LRTI N = 27	Comparador (Evaluación microbiológica, radiológica, de laboratorio)				
		Bacteriana o co infección	Viral	Negativo	% Correcto
Inmunoensayo de doble tira biomodal (para MxA, CRP baja y CRP alta)	Bacteriana o co infección	12	1	1	80 % (12/15)
	Viral	1	4	1	67 % (4/6)
	Negativo	2	1	15	88 % (15/17)
	Total	15	6		27

Tabla 11C

Tabla No. 1					
Combinado N = 54	Comparador (Evaluación microbiológica, radiológica, de laboratorio)				
Inmunoensayo de doble tira biomodal (para MxA, CRP baja y CRP alta)		Bacteriana o coinfección	Viral	Negativo	% Correcto
	Bacteriana o coinfección	17	2	1	85 % (17/20)
	Viral	2	7	1	70 % (7/10)
	Negativo	1	1	22	92 % (22/24)
Total		12	6	9	54

De los 41 pacientes inscritos con LRTI, 26 eran hombres y 15 mujeres con un intervalo de edad de 22-89 años y una edad media de 51 años. De los 19 pacientes inscritos con faringitis, 8 eran hombres y 11 mujeres con un intervalo de edad de 18-69 años y una edad media de 37 años. Los patógenos virales detectados por PCR incluyeron Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 y HSV-1. A tres controles asintomáticos se les detectó rinovirus, pero esto se consideró probable colonización y se excluyó de la confirmación microbiológica.

Las infecciones respiratorias febriles agudas con frecuencia no tienen una etiología confirmada, tanto para las URI tales como la faringitis como para las LRTI como la neumonía adquirida en la comunidad (CAP), a pesar de una amplia combinación de técnicas de diagnóstico microbiológico y molecular, que incluyen pruebas moleculares de patógenos bacterianos y virales. Una revisión de la literatura científica reciente reveló numerosos estudios clínicos prospectivos que evaluaron la etiología de las infecciones respiratorias agudas y reportaron una falla en la detección de patógenos para el 24-44 % de los pacientes (Capelastegui y otros, Etiology of community-acquired pneumonia in a population-based study: link between etiology and patients characteristics, process-of-care, clinical evolution and outcomes. BMC Infect Dis. 2012;12:134; Templeton y otros, Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. Clin Infect Dis. 2005;41:345-51; Huijskens y otros, The value of signs and symptoms in differentiating between bacterial, viral and mixed aetiology in patients with community-acquired pneumonia. J Med Microbiol. 2014;63:441-52; Huijskens y otros, Viral and bacterial aetiology of community-acquired pneumonia in adults. Influenza Other Respi Viruses. 2013;7:567-73; Johansson y otros, Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. Clin Infect Dis. 2010;50:202-9; Endeman y otros, Clinical features predicting failure of pathogen identification in patients with community acquired pneumonia. Scand J Infect Dis. 2008;1-6; Ewig y otros, Factors associated with unknown aetiology in patients with community-acquired pneumonia. Eur Respir J. 2002;20:1254-62). En el presente estudio, el 44 % (24/54) de los pacientes no tuvieron confirmación microbiana de infección. Los pacientes sin confirmación microbiológica y con una respuesta inmune limitada pueden representar un caso clínico potencialmente menos significativo de pacientes sin confirmación microbiológica.

Los resultados de las pruebas microbiológicas tales como la PCR y/o cultivo bacteriano, en combinación con una respuesta inmunitaria acompañante con MxA elevada, sugieren una verdadera infección viral, mientras que la proteína C reactiva se eleva en presencia de una infección bacteriana.

Aunque se trata de un tamaño de muestra pequeño, el inmunoensayo combinado de proteína C reactiva semicuantitativa y MxA de diez minutos por punción digital demostró una sensibilidad y especificidad alentadoras para identificar infecciones clínicamente significativas y ayudó a diferenciar las infecciones febriles agudas virales y/o bacterianas. La prueba no diferenciaba las infecciones bacterianas de las coinfecciones bacterianas/virales. Dado que la presencia de una infección bacteriana impulsa la terapia con antibióticos en casos de coinfección, esto no se consideró una limitación significativa.

Si bien el tamaño de la muestra fue pequeño, especialmente para el grupo de infección viral, y no se inscribieron niños menores de 17 años, la interacción entre un valor semicuantitativo para la proteína C reactiva y MxA parece ayudar en la diferenciación de la etiología infecciosa. Este estudio también usó un método novedoso para categorizar clínicamente a los pacientes sin confirmación microbiológica definitiva de la enfermedad.

La dificultad para obtener muestras relevantes, la baja sensibilidad o especificidad de las pruebas usadas, los altos costos y la ausencia de resultados de las pruebas dentro del período crítico para iniciar el tratamiento adecuado, a menudo resultan en la prescripción de una terapia con antibióticos en ausencia de una infección bacteriana. De forma aislada, ni MxA ni la proteína C reactiva por sí solas son lo suficientemente sensibles o específicas para identificar infecciones virales y/o bacterianas. Sin embargo, un patrón multiplexado de resultados que consta de puntos de decisión médica reflejados en niveles de corte de CRP baja, CRP alta y MxA juntos proporciona una forma sensible y específica de identificar una respuesta inmune a una infección viral y/o bacteriana. El uso de una prueba rápida

conduce a un uso menos innecesario de antibióticos, reduce la resistencia a los antibióticos y reduce los costos de atención médica.

La interacción del inmunoensayo entre un valor de MxA y un valor de proteína C reactiva semicuantitativa puede ayudar a diferenciar la etiología infecciosa. De forma aislada, ni MxA ni la proteína C reactiva por sí solas son sensibles o específicas para identificar infecciones virales y/o bacterianas. Sin embargo, el patrón de resultados en una prueba de 10 minutos en el lugar de atención proporciona un método sensible y específico para diferenciar las infecciones respiratorias febriles agudas. El uso global de este tipo de prueba rápida puede reducir el uso excesivo de antibióticos, reducir la resistencia a los antibióticos y reducir los costos de atención médica.

Este estudio también permitió el uso de proteína C reactiva para diagnosticar infección en pacientes microbiológicamente no confirmados mediante el uso de los métodos de las Figuras 18 y 19.

## Ejemplo 2

El borrador de las directrices clínicas del NICE recomienda el uso de una prueba de proteína C reactiva (CRP) en el lugar de atención con 20 mg/l como punto de corte para identificar infecciones clínicamente significativas de las vías respiratorias inferiores que requieren terapia con antibióticos. La prueba de inmunoensayo de doble tira (que prueba la proteína A de resistencia al mixovirus [MxA], así como también la proteína C reactiva semicuantitativa, ver las Figuras 8-17 y la descripción anterior) se comparó con el uso de proteína C reactiva sola para determinar los posibles resultados de la prescripción de antibióticos.

Se realizó un ensayo de viabilidad clínica prospectivo, multicéntrico y enmascarado en 11 instituciones estadounidenses. Se inscribieron ciento treinta y nueve pacientes consecutivos con presunta infección febril de las vías respiratorias superiores (URI). Dos pacientes se excluyeron debido a la recogida de datos incompleta. A los pacientes calificados con síntomas de URI se les recogieron seis muestras: una muestra de sangre por punción digital para el inmunoensayo de doble tira (prueba de MxA y un nivel alto y bajo de proteína C reactiva), inmunoensayo rápido en el lugar de atención, dos muestras orofaríngeas, una muestra nasofaríngea y dos muestras de sangre venosa. Se combinaron una muestra orofaríngea y nasofaríngea y se enviaron para su análisis con el panel respiratorio por PCR BioFire y pruebas de PCR viral adicionales para virus del herpes simple, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr (VEB). La otra muestra orofaríngea se envió para cultivo celular bacteriano de rutina. Una muestra de sangre venosa midió procalcitonina (PCT), proteína C reactiva, MxA, recuento de glóbulos blancos y niveles de IgM/IgG de EBV. El personal que realizó el inmunoensayo no conocía los resultados de las pruebas confirmatorias. Los niveles umbral para medir la proteína C reactiva y MxA en este estudio fueron 20 mg/l para niveles bajos de CRP, 65 mg/l para niveles altos de CRP y 25 ng/ml para MxA.

Se confirmó una infección viral si la prueba de PCR orofaríngea fue positiva para patógenos virales. Se confirmó una infección bacteriana cuando los cultivos de garganta identificaron crecimiento de estreptococo beta hemolítico del grupo A u otro crecimiento bacteriano en asociación con PCT  $\geq 0,1$  ng/ml. Los sujetos que no tuvieron confirmación microbiológica definitiva de la enfermedad se caracterizaron de acuerdo con los métodos mostrados en la Figura 20. Los sujetos que dieron resultados negativos para niveles de MxA superiores a 25 ng/ml fueron negativos para infección viral.

Más concretamente, si las pruebas microbiológicas, tales como PCR, cultivo, PCT  $\geq 0,1$  ng/ml o detección de antígenos (970), son positivas (972) para bacterias o virus, se diagnostica al paciente una infección bacteriana o viral. Si las pruebas de confirmación microbiológica son negativas (974), se realiza una confirmación de laboratorio adicional (976) mediante el uso de los niveles de PCT. Si los niveles de PCT en la muestra son superiores o iguales a 0,15 ng/ml (978), se diagnostica al paciente (980) una infección bacteriana. Si los niveles de PCT son inferiores a 0,15 ng/ml (982), se diagnostica al paciente (984) como negativo para infección.

De los ciento treinta y siete pacientes inscritos, se confirmó que el 41 % (56) eran infecciosos; 16 % (22) bacterianas, 25 % (34) virales y 59 % (80) enfermedades respiratorias microbiológicamente no confirmadas (MU). En los pacientes con infección bacteriana confirmada, el 95 % (21/22) tenía proteína C reactiva  $\geq 20$  mg/l (ver Figura 21). En pacientes con infección viral confirmada, el 41 % (14/34) tenía proteína C reactiva  $\geq 20$  mg/l (ver Figura 21, un paciente excluido debido a una recogida de datos incompleta). Mediante el uso del biomarcador MxA, la prueba de inmunoensayo de doble tira identificó correctamente al 64 % (9/14) de estos pacientes con infección viral que también tenían una proteína C reactiva asociada  $\geq 20$  mg/l.

La prueba de inmunoensayo de doble tira combina un valor de MxA con un valor de proteína C reactiva semicuantitativa para ayudar a identificar respuestas inmunes clínicamente significativas y puede ayudar en la diferenciación de la etiología infecciosa. El uso de la prueba de inmunoensayo de doble tira reduciría la prescripción excesiva de antibióticos en el 26 % (9/34) de los casos confirmados de infección viral en comparación con el uso de proteína C reactiva sola. La prueba de inmunoensayo de doble tira puede respaldar la administración de antibióticos en el ámbito ambulatorio y limitar la resistencia a los antibióticos, los eventos adversos y los costos de atención médica.

- La interacción entre un valor semicuantitativo de proteína C reactiva y MxA puede ayudar a identificar pacientes con una respuesta inmune subyacente clínicamente significativa consistente con una sospecha de infección respiratoria de aquellos pacientes que representan una enfermedad microbiológicamente no confirmada (MU). Estos marcadores también ayudarán simultáneamente en la diferenciación de infecciones respiratorias febriles agudas virales y bacterianas. Examinados juntos en una prueba en el lugar de atención (POC) de 10 minutos, estos marcadores proporcionan un medio sensible y específico para evaluar la importancia clínica y diferenciar las infecciones respiratorias febriles agudas.
- 5
- 10 El uso de niveles de procalcitonina en pacientes microbiológicamente no confirmados adiciona un valioso indicador diagnóstico a las pruebas diagnósticas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una infección viral, que comprende la etapa de analizar una muestra del paciente para detectar MxA y al menos un biomarcador bacteriano del hospedero que comprende procalcitonina en el mismo dispositivo de ensayo, en donde, si la muestra del paciente tiene un nivel de MxA superior a una media de los valores iniciales de MxA para una población normal más dos veces una desviación estándar de los valores iniciales de MxA en la población normal, al paciente se le diagnostica solo una infección viral, a pesar de que los niveles elevados de al menos una media de los valores iniciales de procalcitonina en una población normal más dos veces una desviación estándar de los valores iniciales de procalcitonina de la población normal del al menos un biomarcador bacteriano del hospedero que comprende procalcitonina están en la muestra.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos un biomarcador bacteriano del hospedero comprende, además, proteína C reactiva.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa de diferenciar entre colonización e infección bacteriana activa si la muestra del paciente tiene un nivel de MxA inferior a la media de los valores iniciales de MxA para la población normal más dos veces una desviación estándar de los valores iniciales de MxA de la población normal, que comprende las etapas de:
  - a) realizar al menos una primera prueba para detectar la presencia de bacterias en una muestra;
  - b) si la muestra es positiva para bacterias, realizar una segunda prueba para detectar la presencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina y/o una presencia de al menos aproximadamente 20 mg/l de proteína C reactiva; en donde una presencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina o al menos aproximadamente 20 mg/l de proteína C reactiva indica visualmente una infección bacteriana activa; en donde una ausencia de al menos aproximadamente 0,10 ng/ml de procalcitonina o al menos aproximadamente 20 mg/l de proteína C reactiva indica visualmente colonización bacteriana.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la primera prueba se selecciona del grupo que consiste en: una prueba molecular, PCR, una prueba radiológica, una prueba de antígeno, un inmunoensayo, un ensayo quimioluminiscente, y un cultivo celular.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además una primera prueba viral para detectar la presencia de un virus, en donde una presencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica una infección viral activa; y una ausencia de al menos aproximadamente 25 ng/ml de MxA indica colonización viral.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la primera prueba viral se selecciona del grupo que consiste en un cultivo viral, prueba de antígeno viral, IFA viral y PCR.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método se realiza mediante el uso de un ensayo de flujo lateral.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el nivel de MxA es 15 ng/ml.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los niveles de procalcitonina son al menos 0,15 ng/ml.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el nivel de MxA es 25 ng/ml.



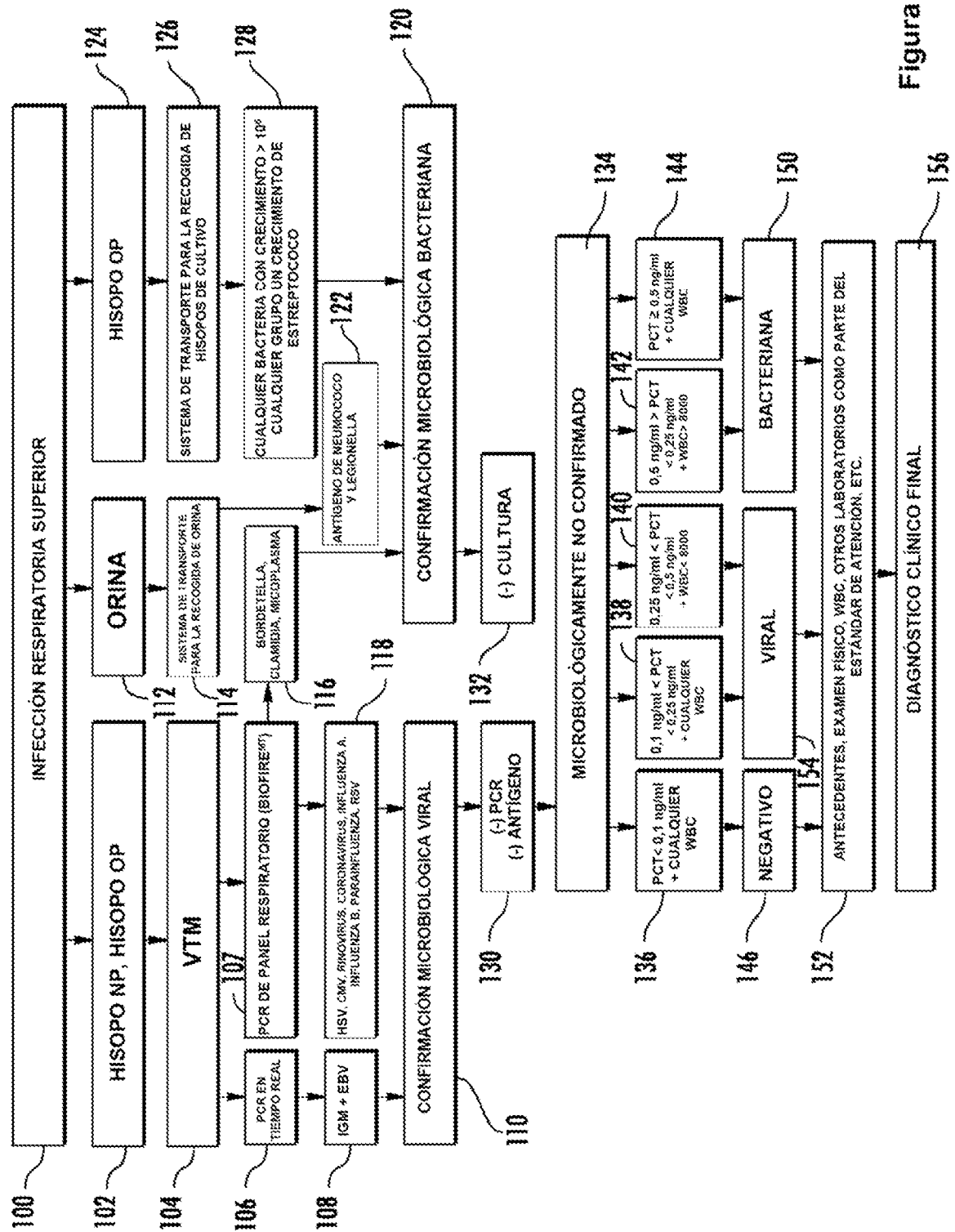


Figura 1

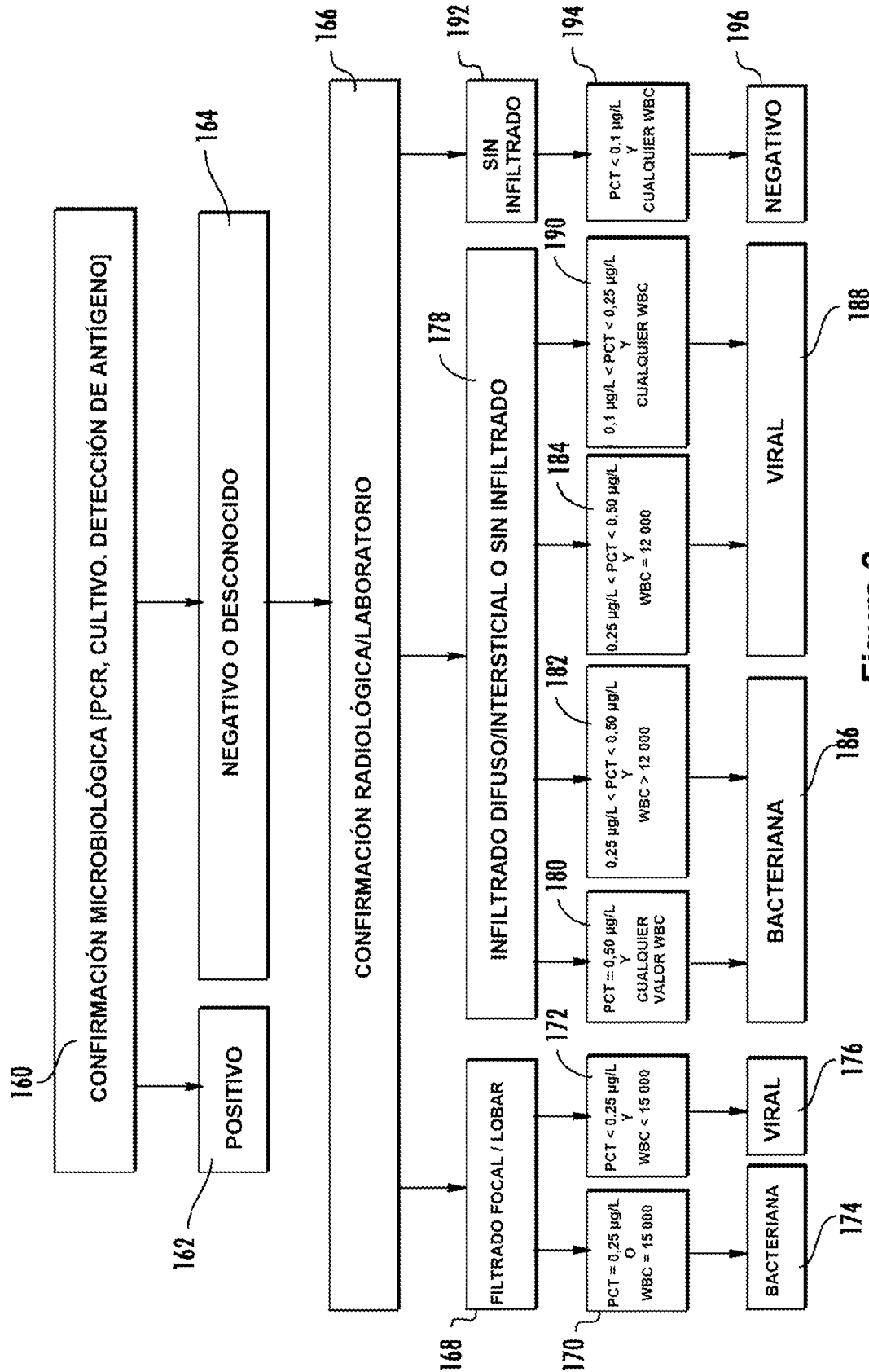
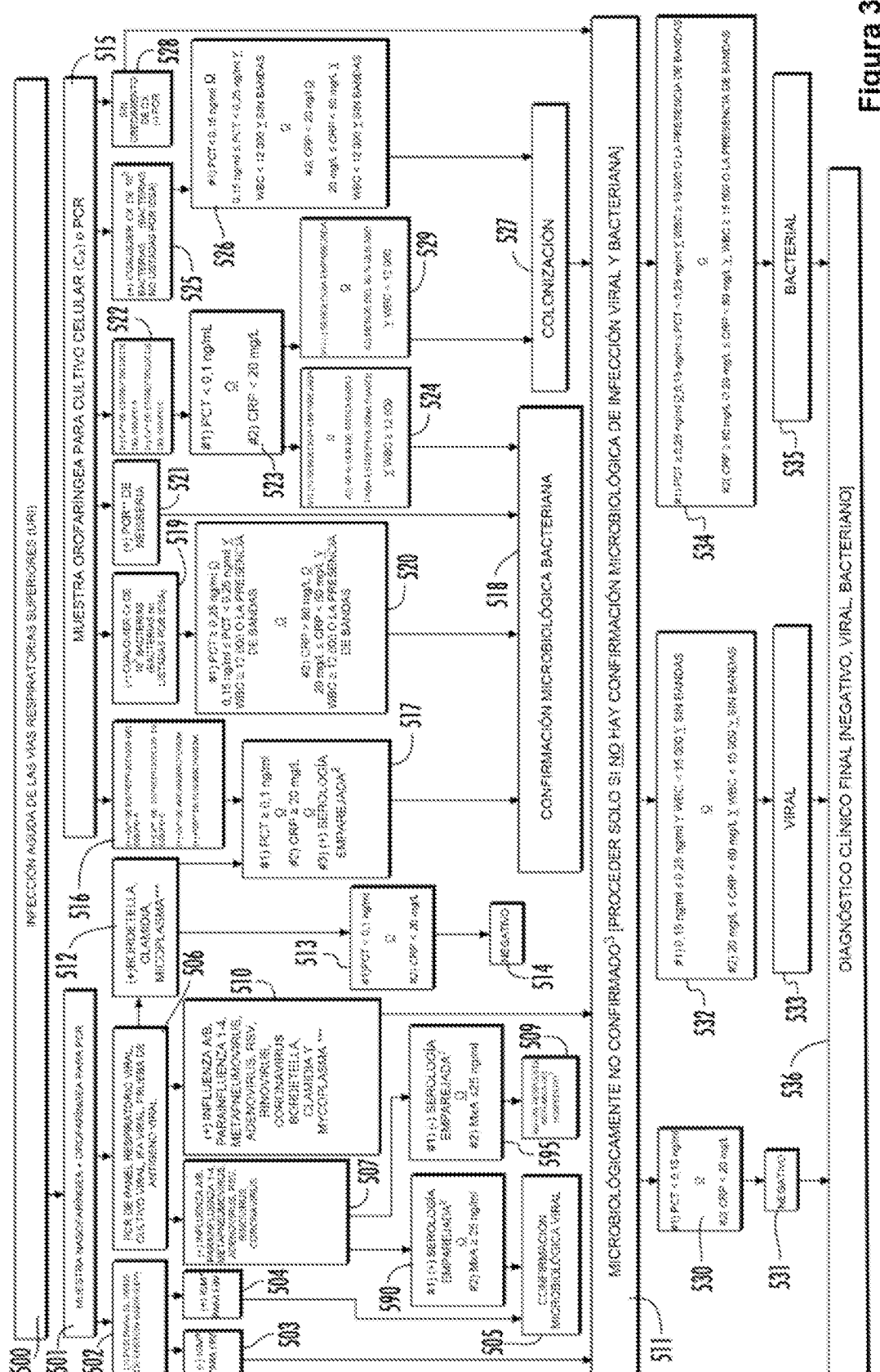


Figura 2



**Figura 3**

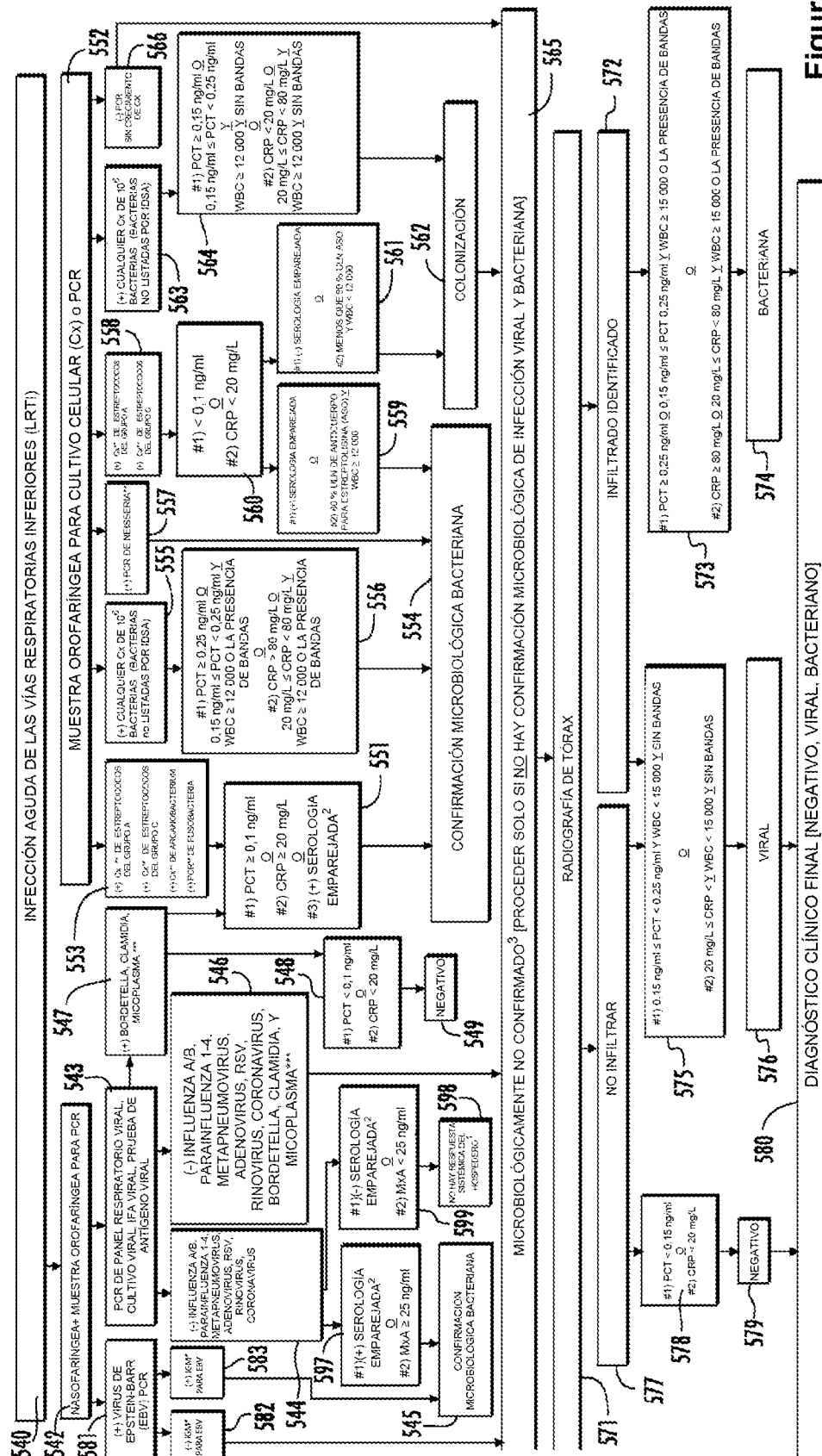


Figura 5A

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
1	0,38	4,218	Estreptococo beta hemolítico del grupo A	bacteriana	Mayor que $10^6$ β de estreptococos hemolíticos del grupo A con PCT elevada
2	0,37		Estreptococo beta hemolítico del grupo A	bacteriana	
3	0,3	0,045		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
4	0,27	1,333	Complejo Enterobacter cloacae	bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
5	0,2	0,65	Estreptococo beta hemolítico del grupo A	bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
6	0,18	0,29	Enterobacter gergoviae	bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
7	0,16	9,125		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
8	0,16	0,432		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
9	0,15	0,418		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
10	0,14	0,781		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
11	0,13	4,174	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	bacteriana	Flora bucal normal; PCR viral respiratoria y atípica negativa; sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
12	0,13	0	STAPHYLOCOCCUS AUREUS BETA LACTAMASA negativo	bacteriana	PCR positiva para Rinovirus con MxA elevada < 27; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
13	0,13	6,608		bacteriana	PCR positiva para virus de Parainfluenza

Figura 5B

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
14	0,11	1,063	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLITICO DEL GRUPO C	bacteriana	Radiografía de íbrax negativa; PCR positiva para rinovirus con MxA < 27 ng/ml lo que es consistente con colonización; > 10 <sup>6</sup> β estreptococos hemolíticos del grupo A con PCT elevada
15	0,11	0,726	GRUPO PROTEUS MIRABILIS/PENNERI	bacteriana	Cultivo de garganta positivo para proteus con PCT elevada
16	0,11	8,358	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	bacteriana	PCR positiva para virus de Influenza B
17	0,11	0,304		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
18	0,11	0,03		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
19	0,1	0,122	Estreptococo del grupo C	bacteriana	Cultivo de garganta positivo para menos de 10 <sup>5</sup> β estreptococos hemolíticos del grupo C con PCT elevada
20	0,1	1,784	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLITICO DEL GRUPO A	bacteriana	Cultivo de garganta positivo para menos de 10 <sup>6</sup> β estreptococos hemolíticos del grupo C con PCT elevada
21	2,8	0,03		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT alta; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
22	0,74		Staphylococcus aureus	bacteriana	Cultivo de Staphylococcus aureus > de 10 <sup>6</sup> con PCT elevado
23	0,09	0,03	Estreptococo beta hemolítico del grupo A	bacteriana	Radiografía de íbrax negativa; PCR positiva para rinovirus con MxA < 27 ng/ml, lo que es consistente con colonización; > 10 <sup>6</sup> β estreptococos hemolíticos del grupo A con PCT elevada
24	0,73			bacteriana	PCR atípica positiva para clamidia
25	0,64	0,562	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLITICO DEL GRUPO C	bacteriana	Menos de 10 <sup>6</sup> β estreptococos hemolíticos del grupo C con PCT elevada; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
26	0,55		Bacilo Gram negativo aislado, No hay más identificación	bacteriana	Bacterias con forma de bacilos Gram negativas con PCT elevada

Figura 5C

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
27	0,52	0,03	HAEMOPHILUS PARAINFLUENZAE	bacteriana	Menos de 10 <sup>6</sup> β Haemophilus con PCT elevada; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
28	0,5	0,026		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada; sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
29	0,39	0,03		bacteriana	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT elevada sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
30	0,1	15,265		Falso negativo viral	PCR e IgM positivas para EBV
31	0,05	13,134		Falso negativo viral	PCR positiva para Influenza A
32	0,05	0,03	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLÍTICO DEL GRUPO B	Falso negativo viral	Cultivo de garganta positivo con flora normal y PCT no elevada; PCR positiva para Coronavirus con MxA < 27 ng/ml lo cual es consistente con colonización; PCR positiva para Influenza A
33	0,05	14,813	ENTEROBACTER AEROGENES	Falso negativo viral	Cultivo de garganta positivo con flora normal y PCT no elevada; PCR positiva para Influenza A
34	0,05	12,994	ESTREPTOCOCCO DEL GRUPO A	Falso negativo viral	Cultivo de garganta positivo para estreptococos del grupo A > 10 <sup>6</sup> y PCT no elevada; PCR positiva para virus de parainfluenza 3
35	0,05	0,036		Falso negativo viral	PCR positiva para Influenza B
36	0,07	0,03		Falso negativo viral	PCR positiva para virus de Parainfluenza 2 y Metapneumovirus
37	0,05	15,775		Falso negativo viral	IgM para EBV positiva
38	0,05	8,062	ACINETOBACTER BAUMANNII	Falso negativo viral	Cultivo de garganta positivo con flora normal Menos de 10 <sup>6</sup> y PCT no elevada; PCR positiva para Influenza A
39	0,05	6,51		Falso negativo viral	PCR positiva para Influenza A

Figura 5D

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
40	0,05	13,953		negativo	PCR de rinovirus positiva con MxA <20 ng/ml, lo que es consistente con colonización; Menos de 10 <sup>6</sup> β estreptococos hemolíticos del grupo A con PCT no elevado; negativo para infección
41	0,05	34,978		Falso positivo viral	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
42	0,05	50,508	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLÍTICO DEL GRUPO A	negativo	Cultivo de garganta positivo Menos de 10 <sup>6</sup> β estreptococos hemolíticos del grupo C sin PCT elevada; sin confirmación microbiana, diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
43	0,05	30,764		Falso positivo viral	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada junto con Streptococcus pneumoniae no es un patógeno primario de faringitis; Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
44	0,05	19,127	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLÍTICO DEL Grupo B	negativo	Menos de 10 <sup>6</sup> β estreptococos hemolíticos del grupo A con PCT no elevada
45	0,05	12,595		negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA < 20 ng/ml, lo que es consistente con colonización; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
46	0,05	11,064		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
47	0,05	10,948		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
48	0,05	10,299	Klebsiella pneumonia	negativo	Flora oral normal sin PCT elevada; PCT positiva para rinovirus con MxA <20 ng/ml, lo que es consistente con colonización;
49	0,05	9,939		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
50	0,05	9,804		negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA no elevada; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
51	0,05	9,05		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico



Figura 5E

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
52	0,05	8,716		negativo	Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
53	0,05	7,819		negativo	PCR positiva para Coronavirus con MxA < 20 ng/ml lo cual es consistente con colonización; Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
54	0,05	6,477	STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE	negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA < 20 ng/ml, lo que es consistente con colonización; Menos de 10 <sup>6</sup> β estreptococos hemolíticos del grupo A con PCT no elevada; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
55	0,05	6,271	ESPECIES DE ACINETOBACTER STAPHYLOCOCCUS AUREUS	negativo	Cultivo de garganta positivo con flora normal y PCT no elevada; PCR positiva para coronavirus con MxA < 27 ng/ml, lo que es consistente con colonización; Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
56	0,05	4,492		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
57	0,05	3,72		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
58	0,05	3,434	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	negativo	Cultivo de garganta positivo con flora normal Menos de 10 <sup>6</sup> y PCT no elevada; sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
59	0,05	3,069		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
60	0,05	2,987		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
61	0,05	2,549	Estreptococo del grupo A	negativo	Cultivo de garganta positivo para estreptococos del grupo A > 10 <sup>6</sup> y PCT no elevada
62	0,05	2,44		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico

Figura 5F

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
63	0,05	2,438		negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA <20 ng/ml, lo que es consistente con colonización; Menos de 106 β estreptococos hemolíticos del grupo A con PCT no elevada; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
64	0,05	2,285		negativo	PCR viral: respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
65	0,06	2	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLÍTICO DEL GRUPO A	negativo	Cultivo de estreptococos sin elevación asociada de PCT; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
66	0,05	1,987		negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA < 20 ng/ml, lo que es consistente con colonización; sin elevación significativa en PCT; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
67	0,05	1,568	Streptococo pneumoniae	negativo	Cultivo de garganta positivo con Streptococcus pneumoniae inferior a 106 y PCT no elevada; sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
68	0,05	1,539		negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA < 20 ng/ml, lo que es consistente con colonización; Menos de 106 β estreptococos hemolíticos del grupo A con PCT no elevada; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
69	0,05	1,331	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLÍTICO DEL GRUPO B	negativo	Cultivo de garganta positivo con flora normal y PCT no elevada; sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
70	0,05	1,213	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLÍTICO DEL GRUPO A	negativo	Estreptococos hemolíticos del grupo A menos de 106 β con PCT no elevada; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
71	0,05	0,595		negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA < 27 ng/ml, lo que es consistente con colonización; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
72	0,05	0,536	Estreptococo hemolítico del grupo A	negativo	Radiografía de tórax negativa; sin PCT elevada; Posible colonización del cultivo celular del grupo A
73	0,05	0,276	ESTAPHYLOCOCCUS AUREUS ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLÍTICO DEL GRUPO B	negativo	Cultivo de garganta positivo con flora normal Menos de 106 y PCT no elevada; PCR+ de coronavirus con MxA < 27 ng/ml lo cual es consistente con colonización; Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico

Figuras 5G

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
74	0,05	0,276	ESTREPTOCOCCO BETA HEMOLÍTICO DEL GRUPO B STAPHYLOCOCCUS AUREUS	negativo	Cultivo de garganta positivo con flora normal. Menos de 10 <sup>6</sup> y PCT no elevada; sin confirmación microbiana, diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
75	0,05	0,275		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
76	0,05	0,215		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
77	0,05	0,179	Estreptococos del grupo C	negativo	Cultivo de garganta positivo con estreptococos del grupo C, menos de 10 <sup>6</sup> y PCT no elevada; Sin confirmación microbiana, diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
78	0,05	0,174		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
79	0,05	0,103		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
80	0,06	0,03	Staphylococcus aureus	negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
81	0,05	0,03	Grupo Proteus mirabilis penneri	negativo	PCR negativa; Cultivo negativo; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
82	0,08	0,03	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada; Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
83	0,05	0,03	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	negativo	Cultivo de garganta positivo con flora normal y PCT no elevada; sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
84	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
85	0,08	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
86	0,07	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico

Figura SH

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
87	0,07	0,03	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
88	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
89	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
90	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
91	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
92	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
93	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
94	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
95	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
96	0,05	0,03		negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
97	0,05	0,03	Staphylococcus aureus del grupo B	negativo	Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
98	0,05	0,03		negativo	PCR positiva para HSV en un paciente mayor y MxA baja consistente con diseminación. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
99	0,05	0,03		negativo	PCR positiva para HSV en un paciente mayor y MxA baja consistente con diseminación. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico

Figura 5f

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
100	0,05	0,03		negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA <20 ng/ml, lo que es consistente con colonización, sin elevación significativa en PCT; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
101	0,05	0,03	CITROBACTER FREUNDII	negativo	Cultivo de garganta positivo con flora normal. Menos de 10 <sup>6</sup> y PCT no elevada; sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
102	0,05	0,03	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
103	0,05	0		negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA elevada < 20; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
104	0,05	0	CANDIDA ALBICANS	negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA elevada < 20; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
105	0,05	0		negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA elevada < 20; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
106	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
107	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
108	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
109	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
110	0,05		Streptococo beta hemolítico del grupo B	negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
111	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
112	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada. Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico

Figura 5J

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
113	0,05		Complejo Enterobacter cloacae	negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
114	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
115	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
116	0,07			negativo	Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
117	0,05	MRSA		negativo	Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
118	0,05			negativo	Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
119	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
120	0,05			negativo	PCR viral respiratoria y atípica negativa; PCT no elevada Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
121	0,05			negativo	PCR positiva para rinovirus con MxA < 20 ng/ml, lo que es consistente con colonización; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
122	0,05		Estreptococo pyogenes beta hemolítico del grupo A	negativo	Cultivo de garganta + con estreptococos del grupo A menos de 10 <sup>3</sup> y PCT no elevada; Sin confirmación microbiana; diagnosticado con un nuevo método de diagnóstico
123	0,05	67,715		Viral	PCR positiva para virus de Influenza B
124	0,05	52,343		Viral	PCR positiva para virus de Influenza B
125	0,05	48,03	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	viral	Cultivo de garganta positivo con flora normal y PCT no elevada; PCR positiva para Influenza B
126	0,05	47,526	STREPTOCOCCUS DEL GRUPO C	viral	Cultivo de garganta para estreptococos del grupo C menos de 10 <sup>3</sup> y PCT no elevada; PCR positiva para Influenza A

Figura 5K

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
127	0,05	44,474	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	viral	Cultivo de garganta positivo con flora normal y PCT no elevada; PCR + Influenza A
128	0,05	42,426		Viral	PCR positiva para Rinovirus con MxA elevada > 20
129	0,05	41,398		viral	PCR positiva para Influenza B
130	0,05	31,997		viral	PCR positiva para Parainfluenza 3
131	0,05	30,732		viral	PCR positiva para Influenza B
132	0,05	30,614		viral	PCR positiva para Influenza B
133	0,05	29,462		viral	PCR positiva para Influenza B
134	0,05	27,961	ESTREPTOCOCCOS DEL GRUPO C	viral	Cultivo de garganta positivo con estreptococos del grupo C menos de 10 <sup>5</sup> y PCT no elevada; PCR + Influenza B
135	0,05	27,734		viral	PCR positiva para Influenza A
136	0,06	23,883		Viral	PCR positiva para CMV
137	0,05	70,206		viral	PCR positiva para Influenza A
138	0,05	68,514		viral	PCR positiva para RSV
139	0,05	61,15		viral	PCR positiva para Influenza B

Figura 5L

Paciente	Nivel de PCT (ng/ml)	Nivel de MxA (ng/ml)	Organismo de cultivos de garganta	Diagnóstico final	Descripción/comentarios
140	0,05	56,589	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	viral	Cultivo de garganta positivo con flora normal y PCT no elevada; Sin confirmación microbiana, diagnosticado con método diagnóstico novedoso: PCR positiva para HSV asociada con MxA elevada consistente con nueva infección en un paciente más joven
141	0,05	47,396		viral	La PCR positiva para rinovirus en presencia de MxA elevada > 20 ng/ml es un signo de una infección verdadera
142	0,05	32,068		viral	La PCR positiva para rinovirus en presencia de MxA elevada > 20 ng/ml es un signo de una infección verdadera
143	0,05	29,817	ENTEROBACTER CLOACAE KLEBSIELLA PNEUMONIAE CRONOBACTER	viral	Cultivo de garganta con crecimiento polimicrobiano de flora oral normal: PCR positiva para rinovirus en presencia de MxA elevada > 27 ng/ml es un signo de una infección verdadera
144	0,05	28,834		viral	La PCR positiva para rinovirus en presencia de MxA elevada > 20 ng/ml es un signo de una infección verdadera
145	0,05	22,036	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	viral	Cultivo de garganta positivo con flora normal y PCT no elevada; Sin confirmación microbiana, diagnosticado con método diagnóstico novedoso: PCR positiva para Influenza A y clamidia con MxA elevada y PCR normal es consistente con colonización de influenza y clamidia
146	0,07	20,189		viral	PCR positiva para Rinovirus con MxA > 20 ng/ml
147	0,07	20,153		viral	PCR positiva para Influenza A
148	0,05	20,074		viral	PCR positiva para virus de Influenza B



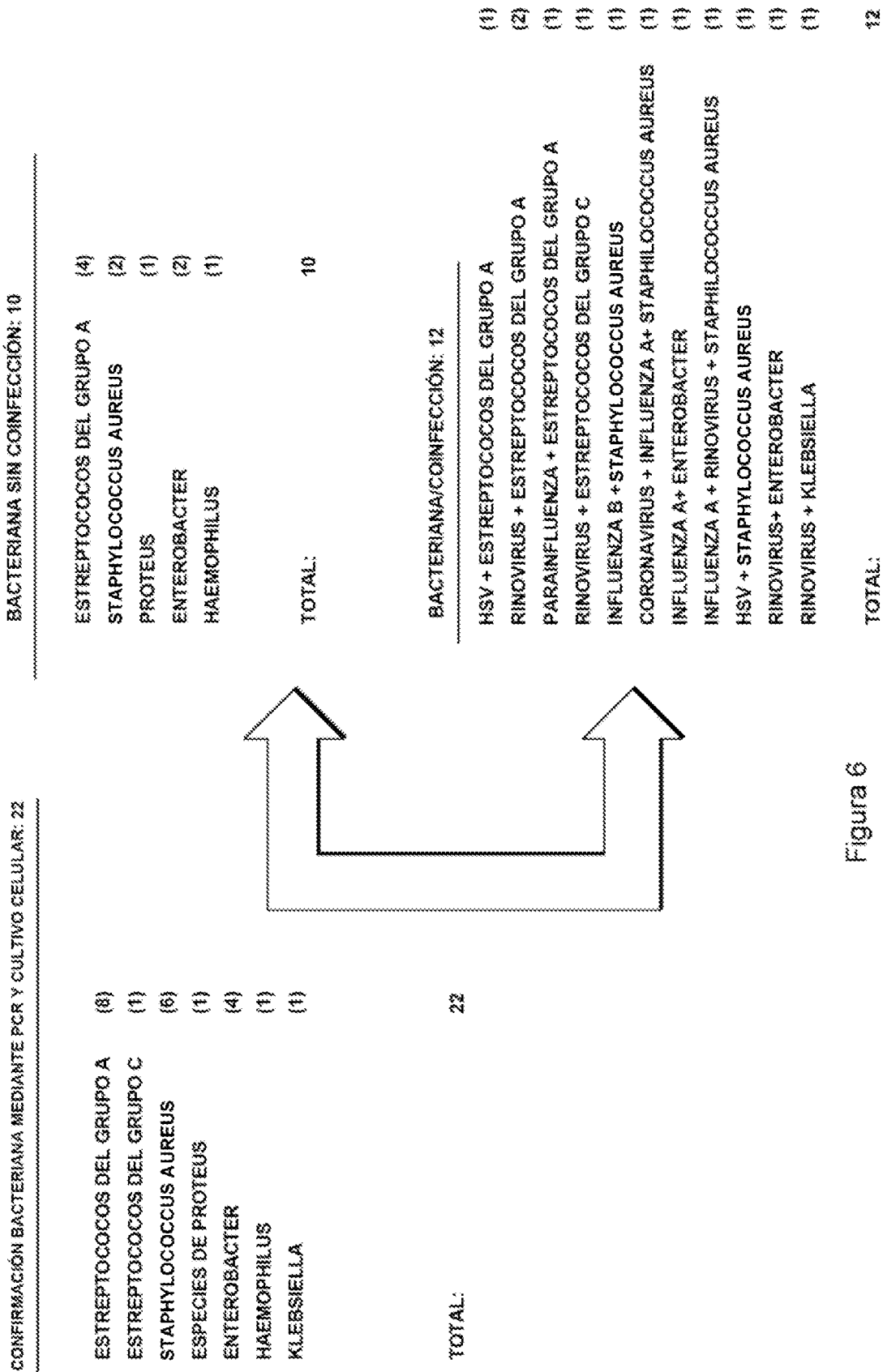


Figura 6

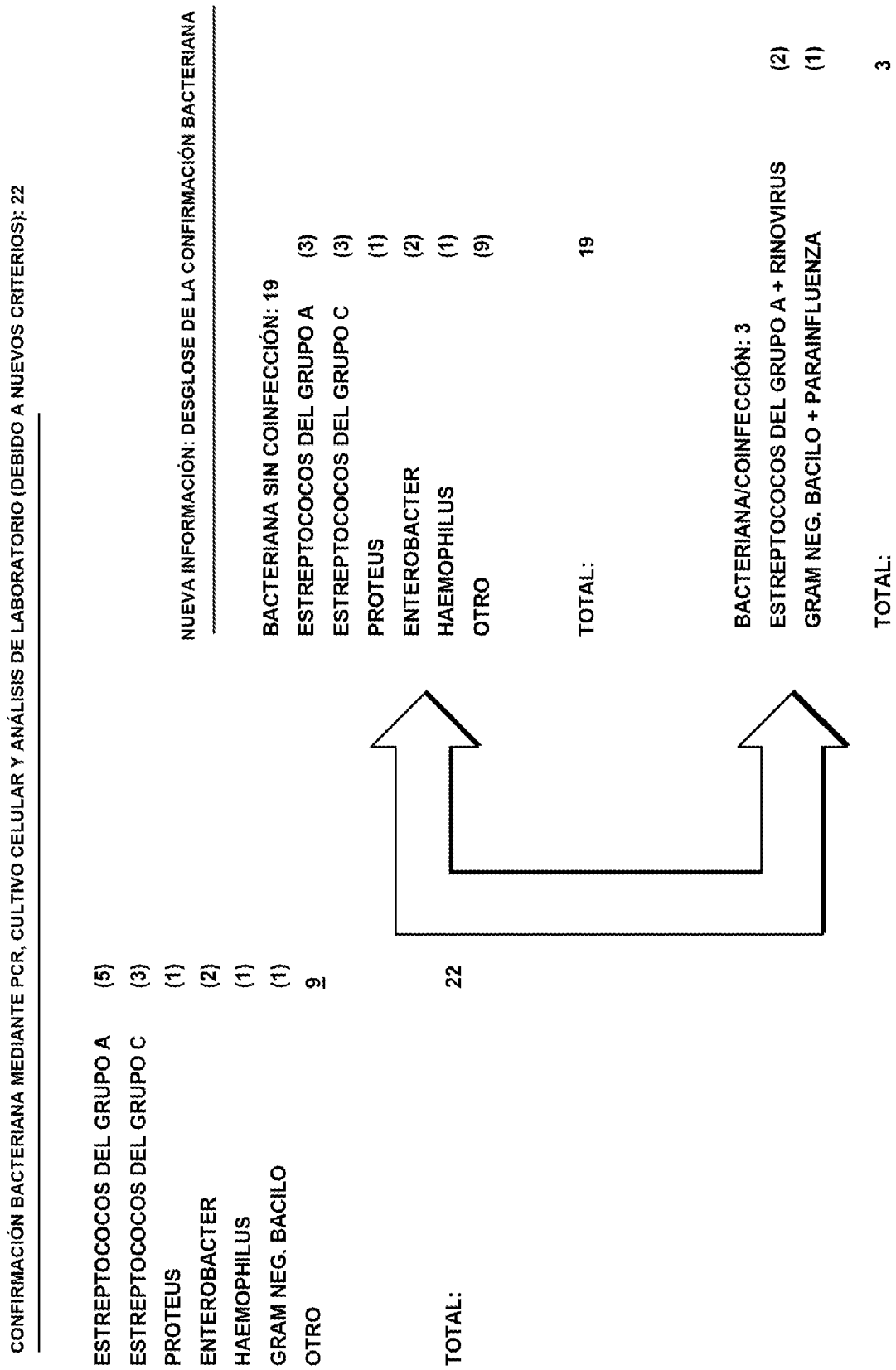


Figura 7

Figura 8

Estado de la enfermedad	Resultado de la prueba visual	Proteína C reactiva (> 15mg/L)	MxA (> 235 ng/ml)
Infección Viral	A	Negativo	Positivo
Infección Bacteriana	B	Positivo	Negativo
Coinfección	C	Positivo	Positivo
No infeccioso	D	Negativo	Negativo

	Línea de Control	Prueba de CRP	Prueba MxA	
A				Infección viral
B				Infección bacteriana
C				Coinfección
D				No infeccioso

Figura 9A

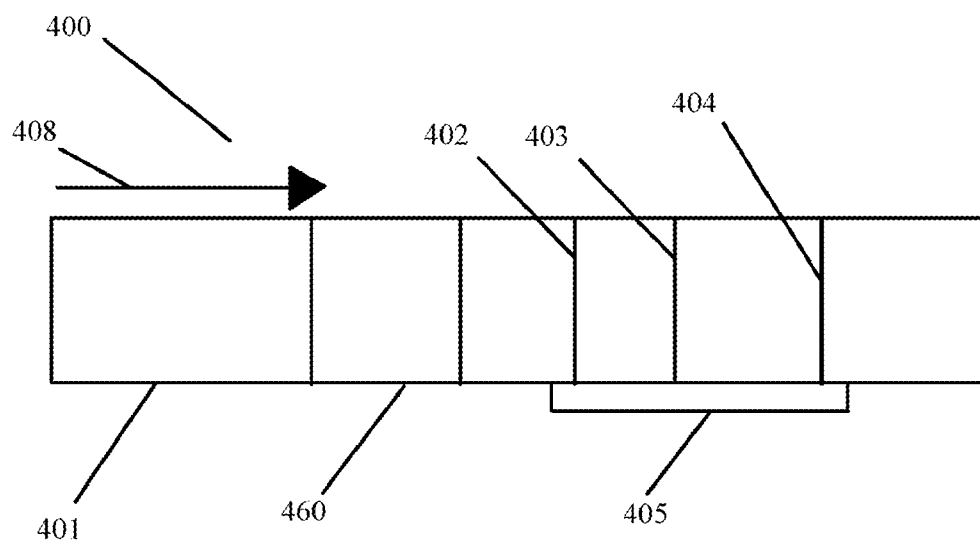


Figura 9B

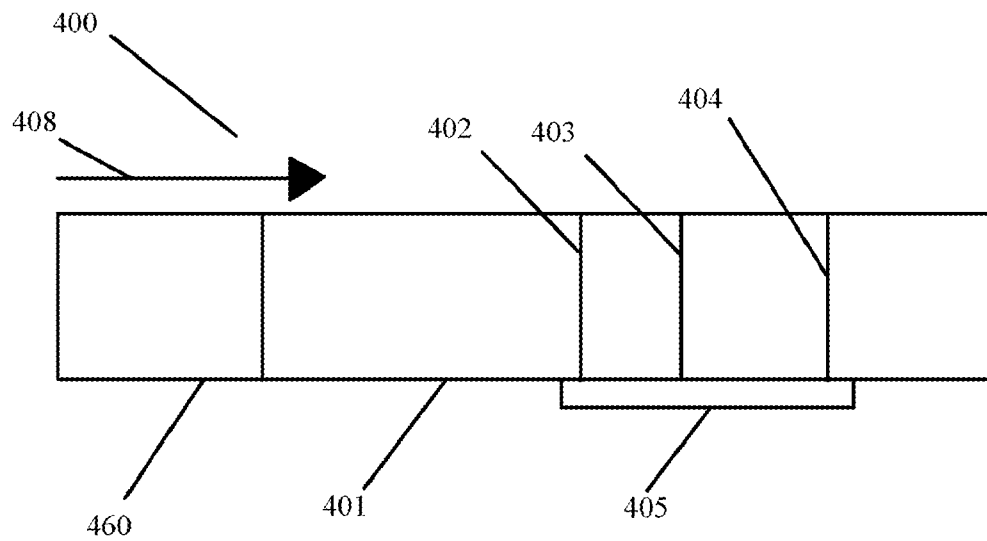


Figura 10A

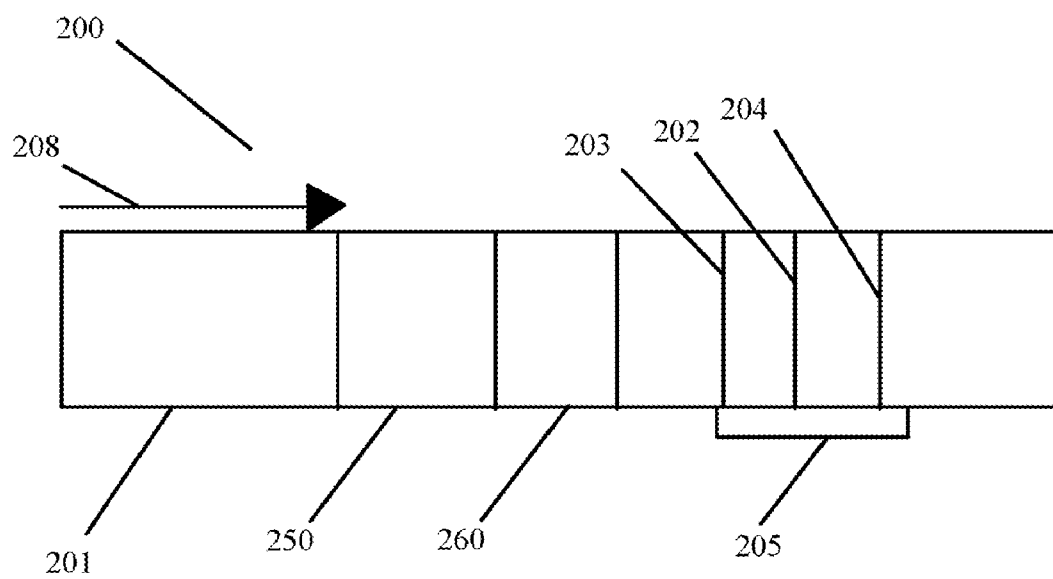


Figura 10B

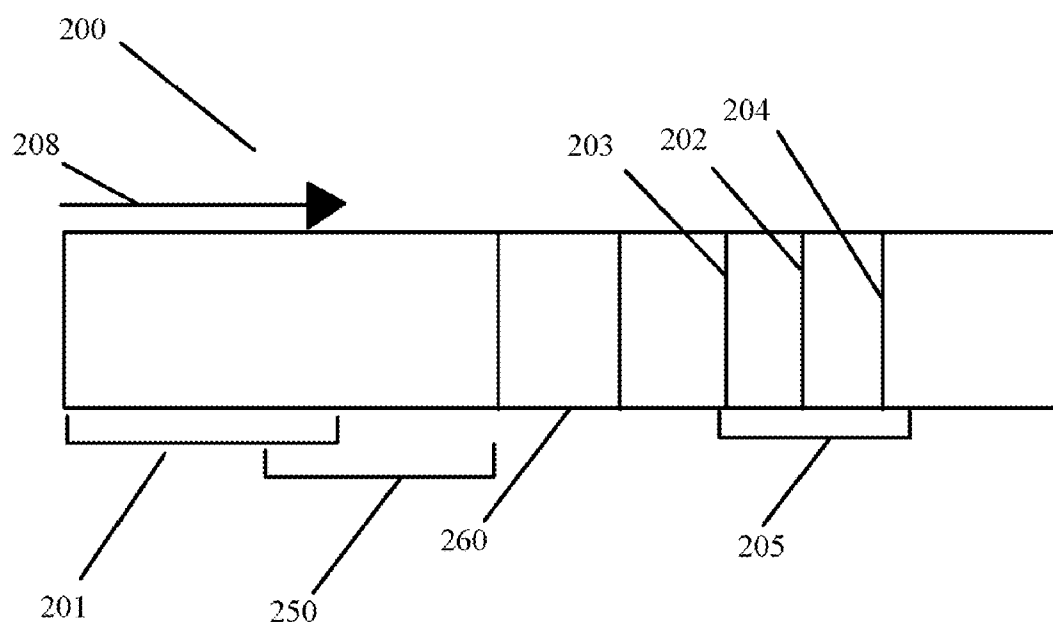


Figura 10C

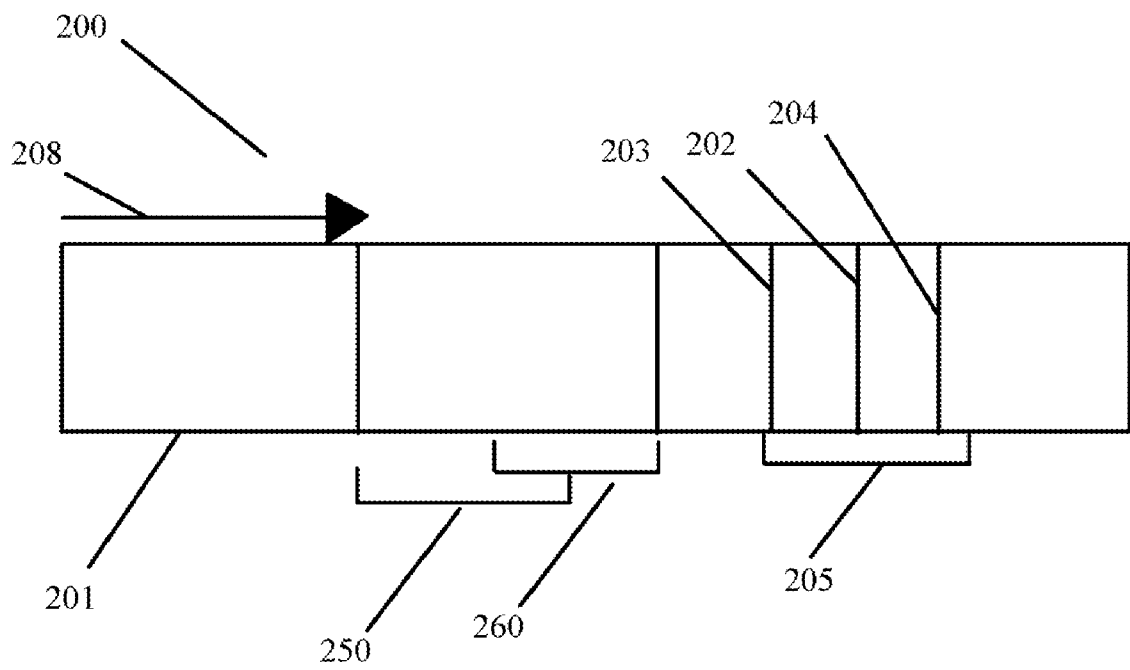


Figura 10D

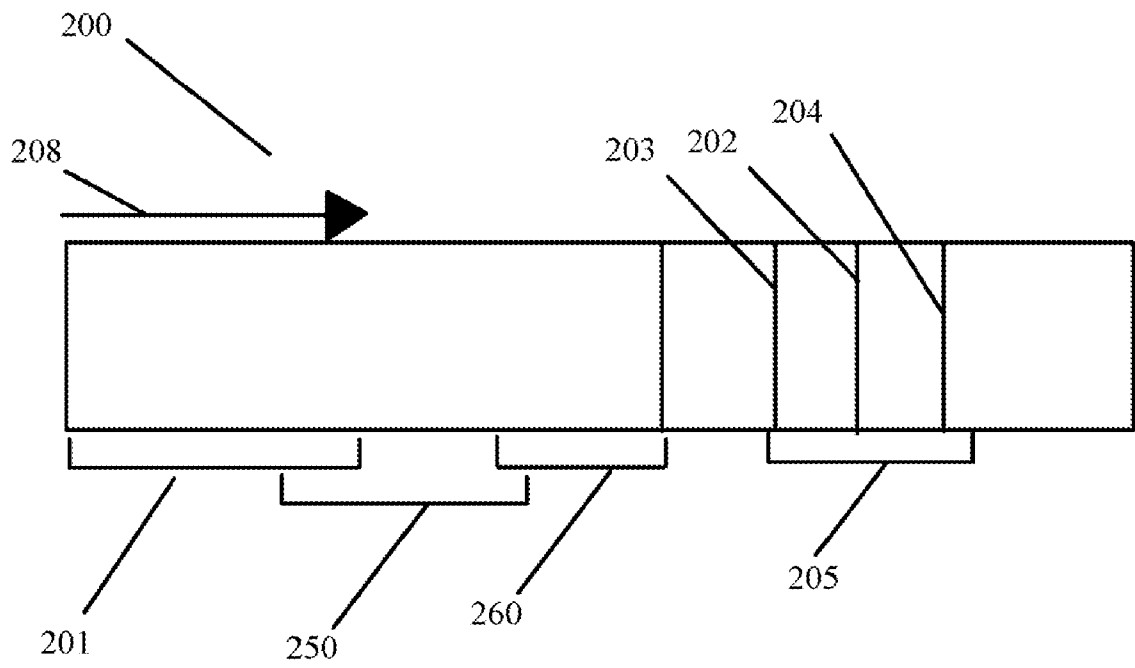


Figura 11A

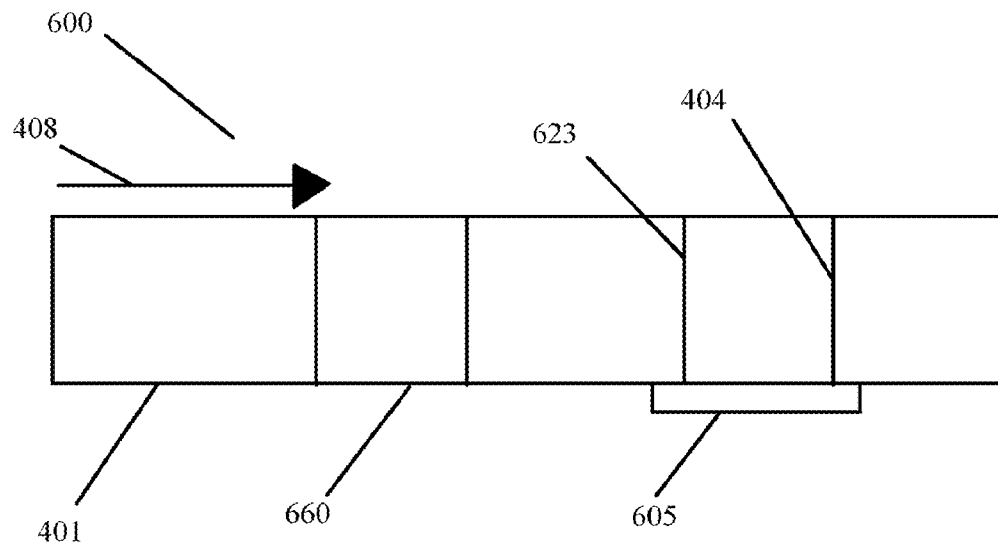


Figura 11B

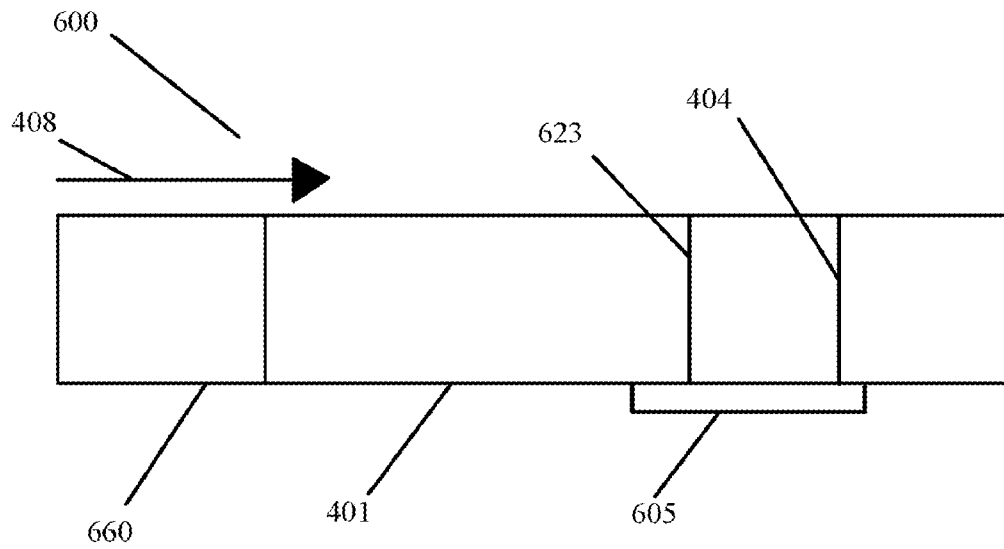


Figura 12A

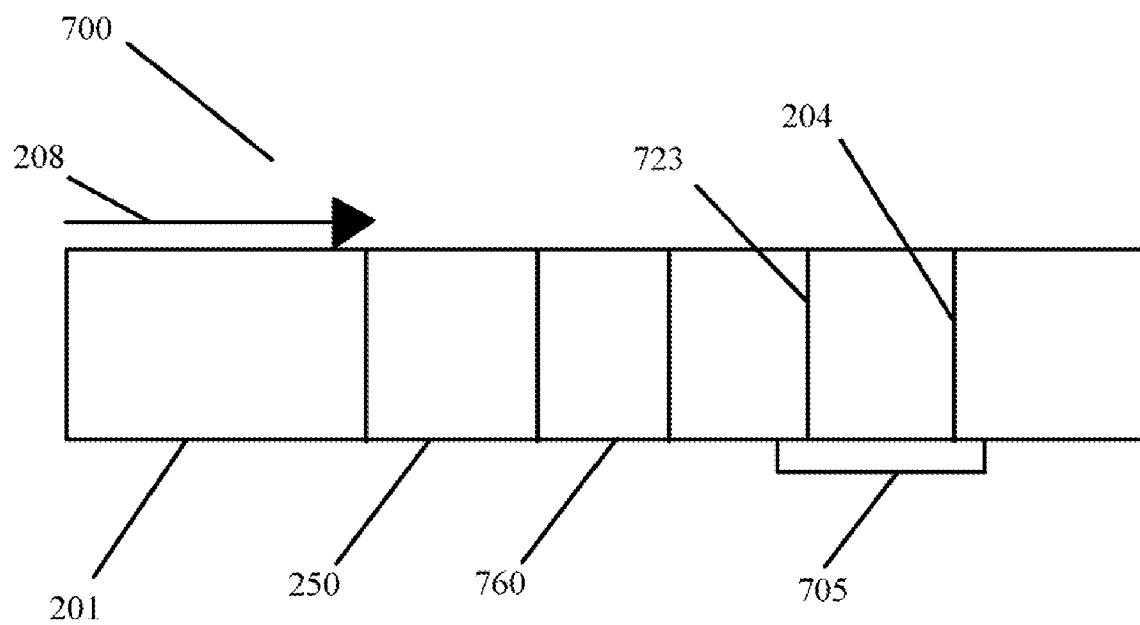


Figura 12B

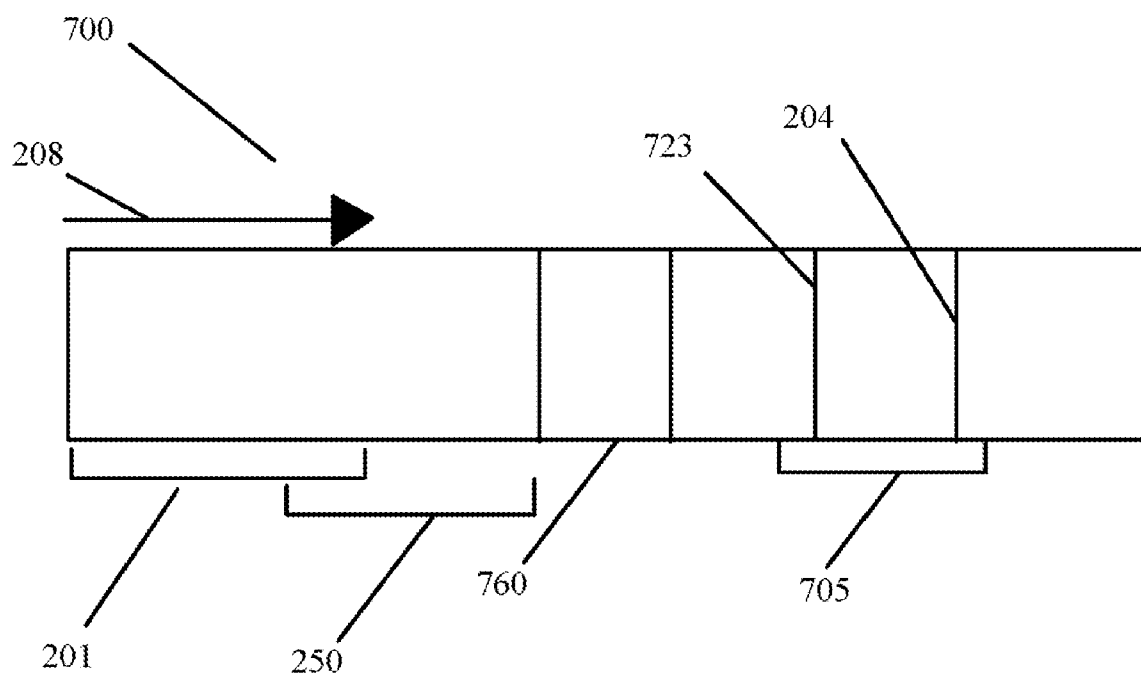




Figura 12C

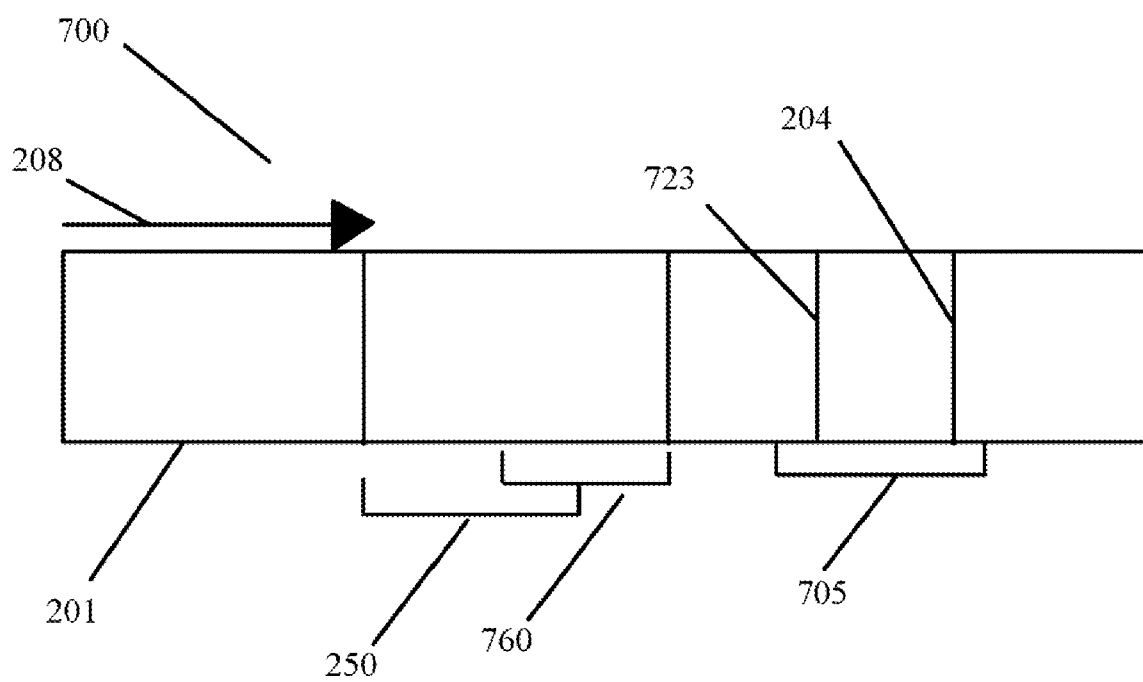
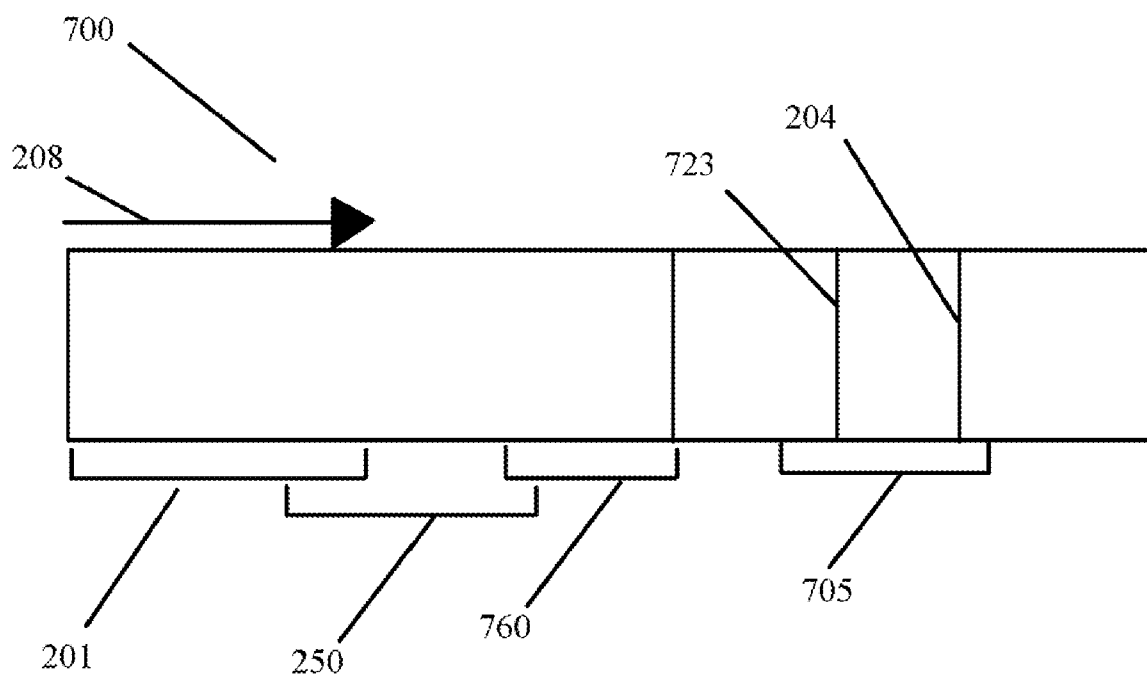


Figura 12D



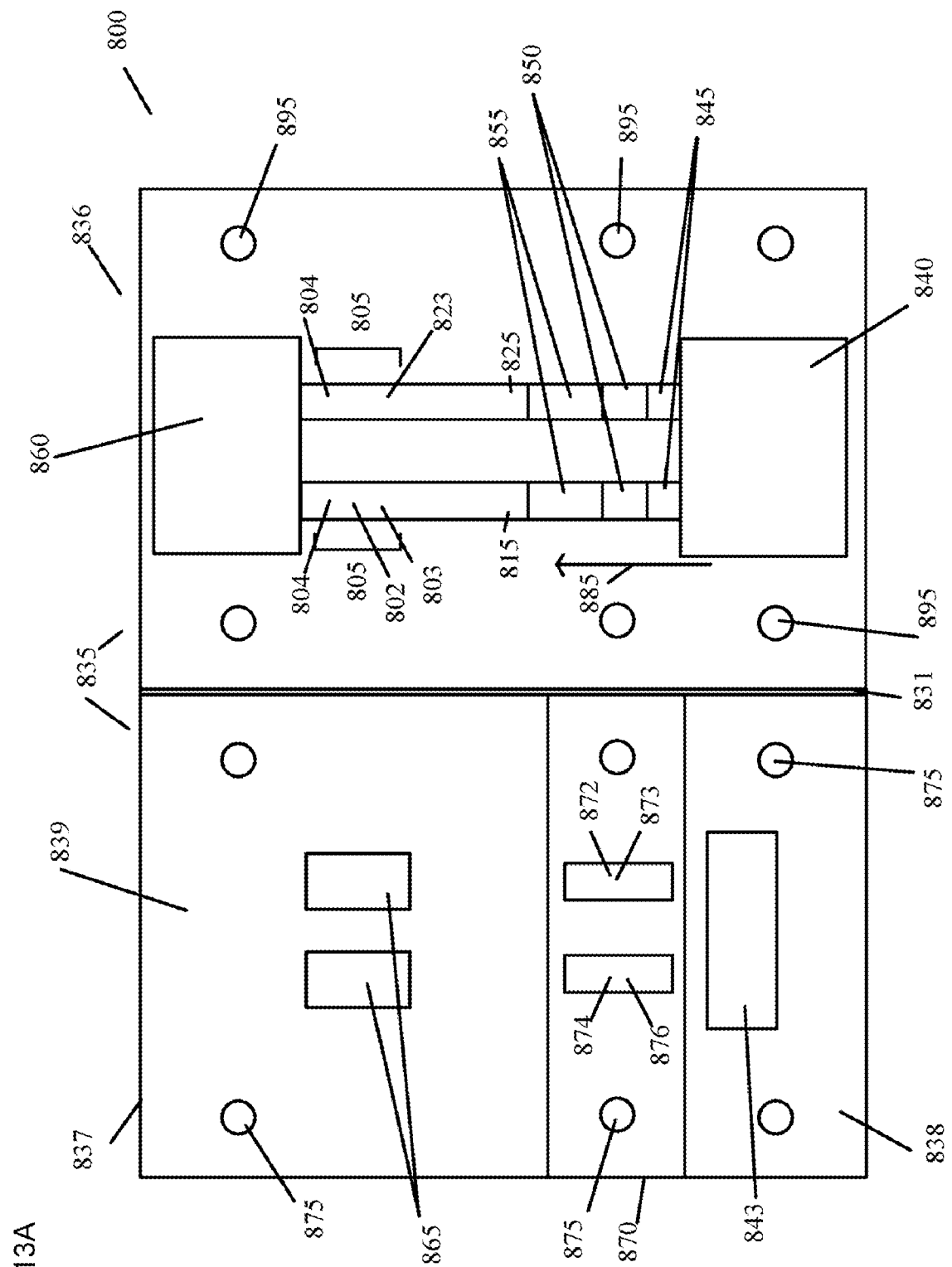


Figura 13A

Figura 13B

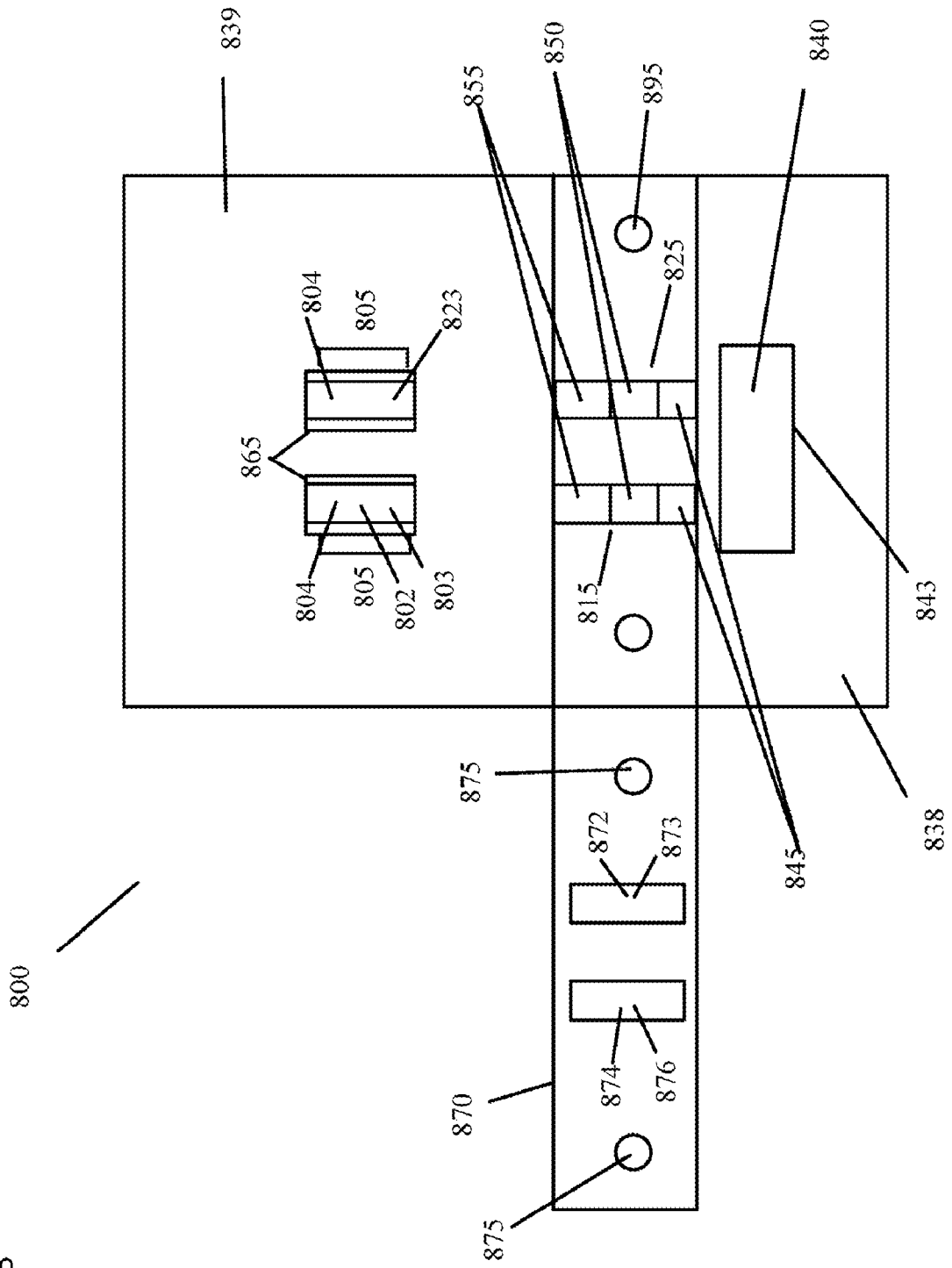


Figura 13C

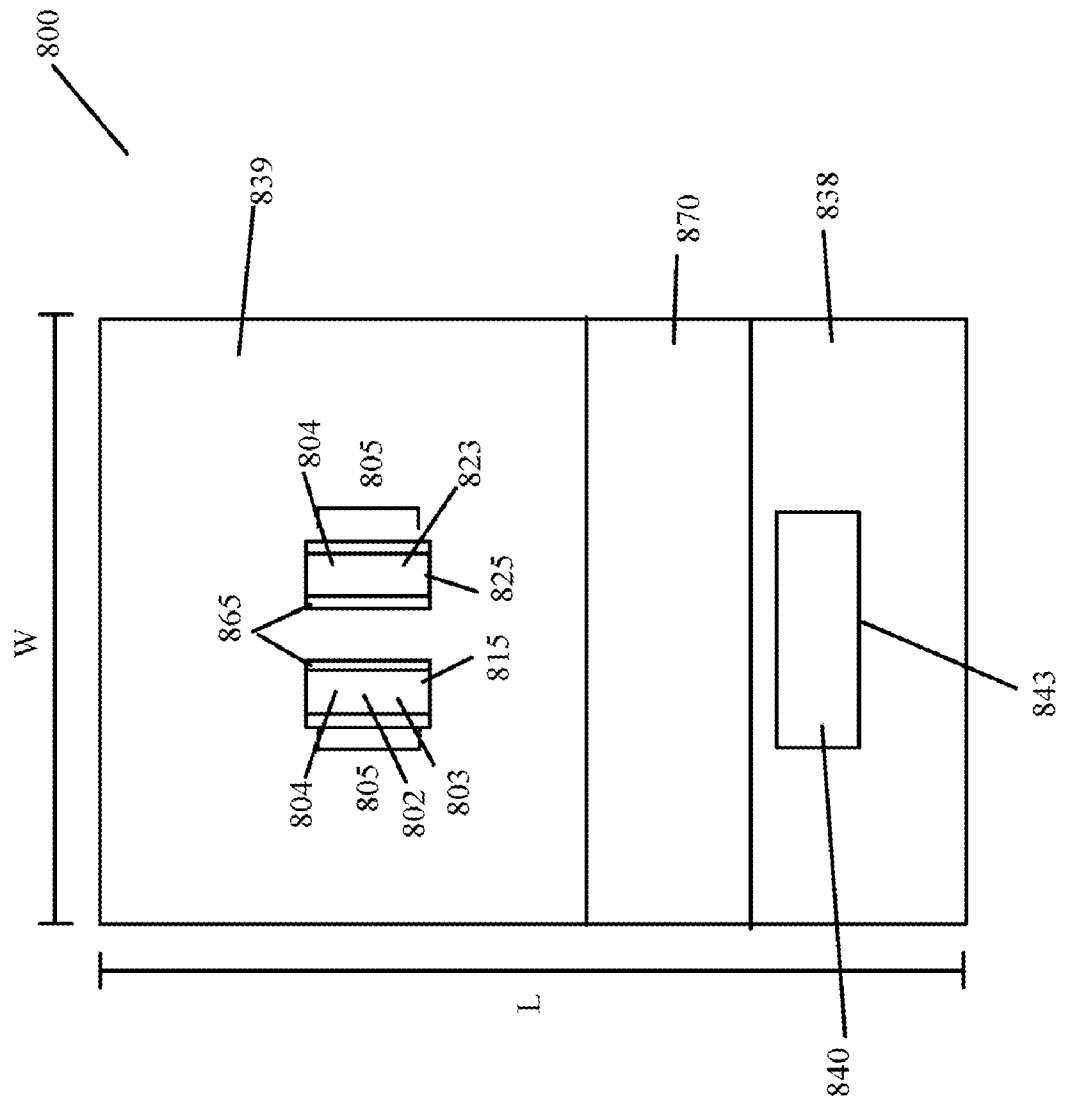


Figura 14A

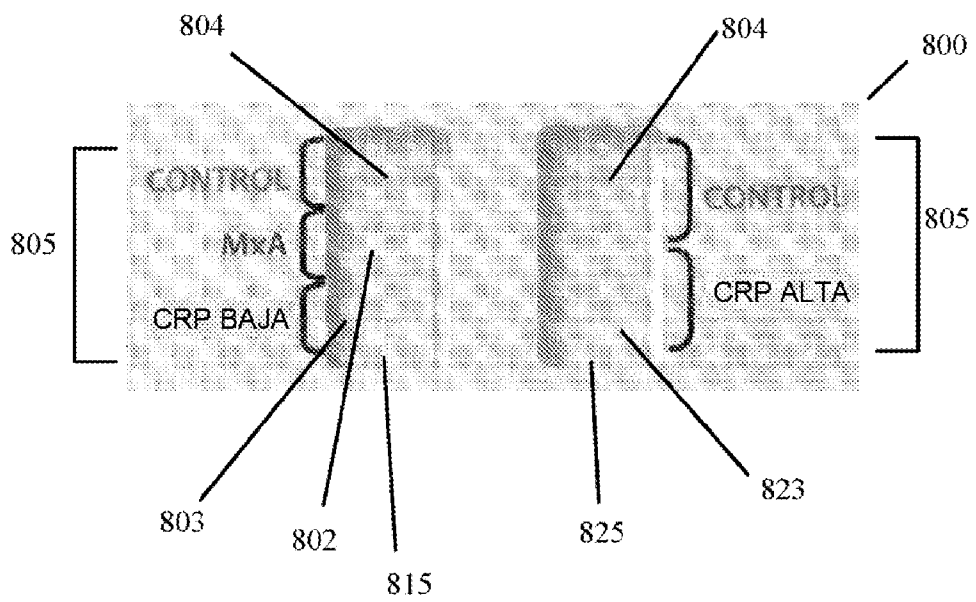


Figura 14B

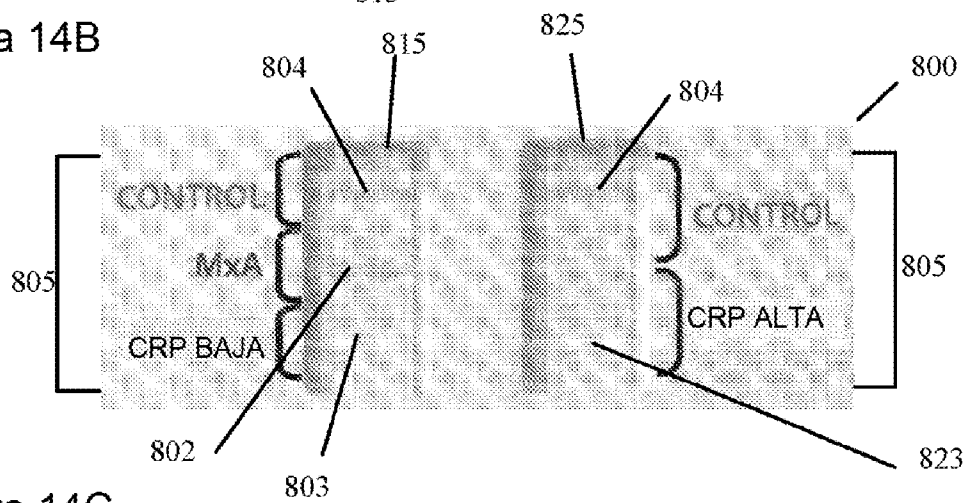


Figura 14C

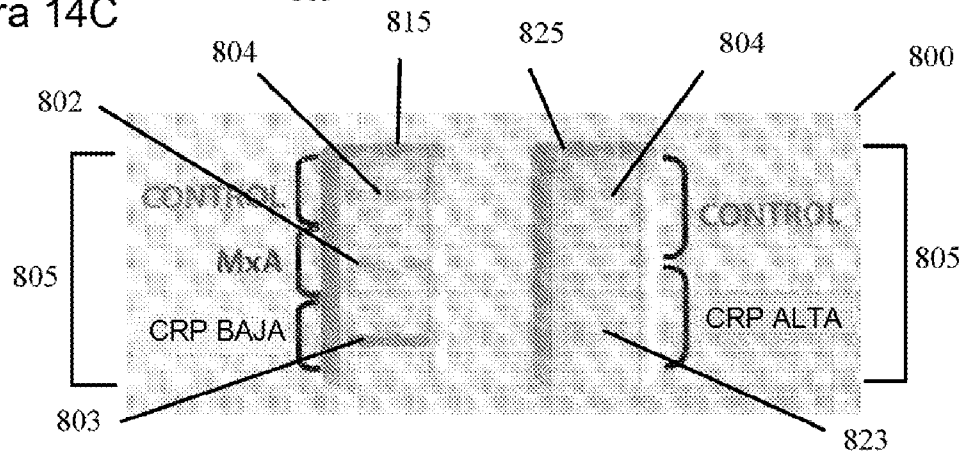


Figura 14D

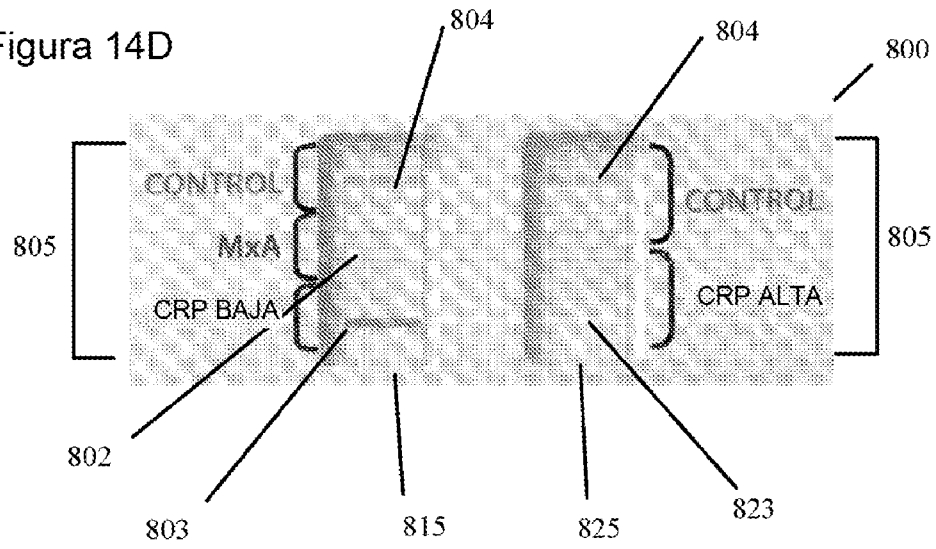


Figura 14E

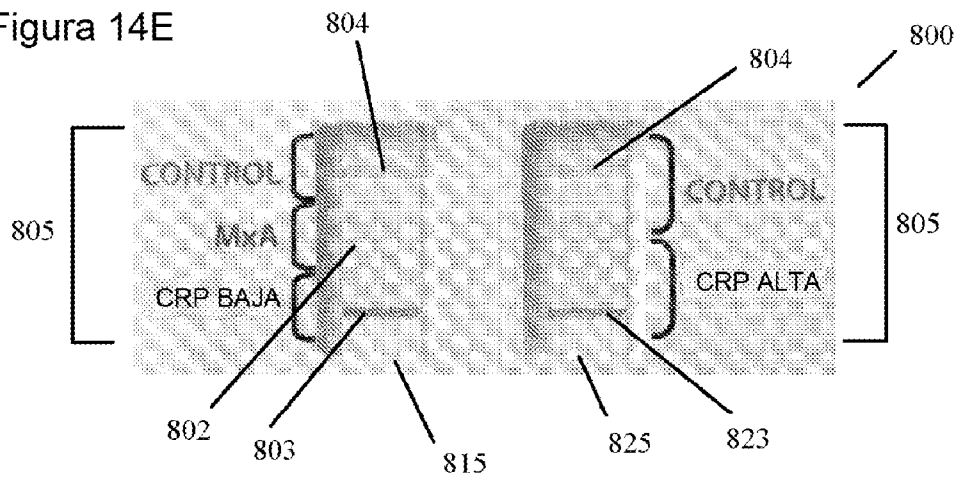
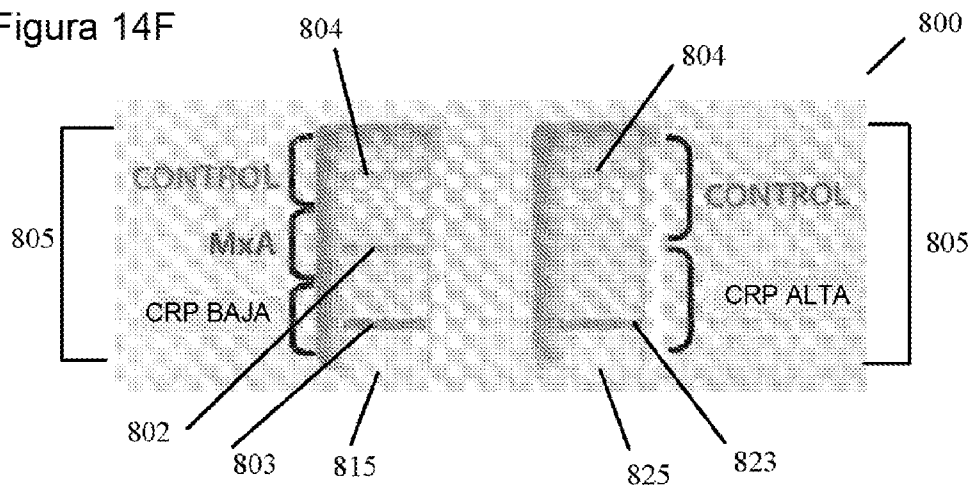


Figura 14F



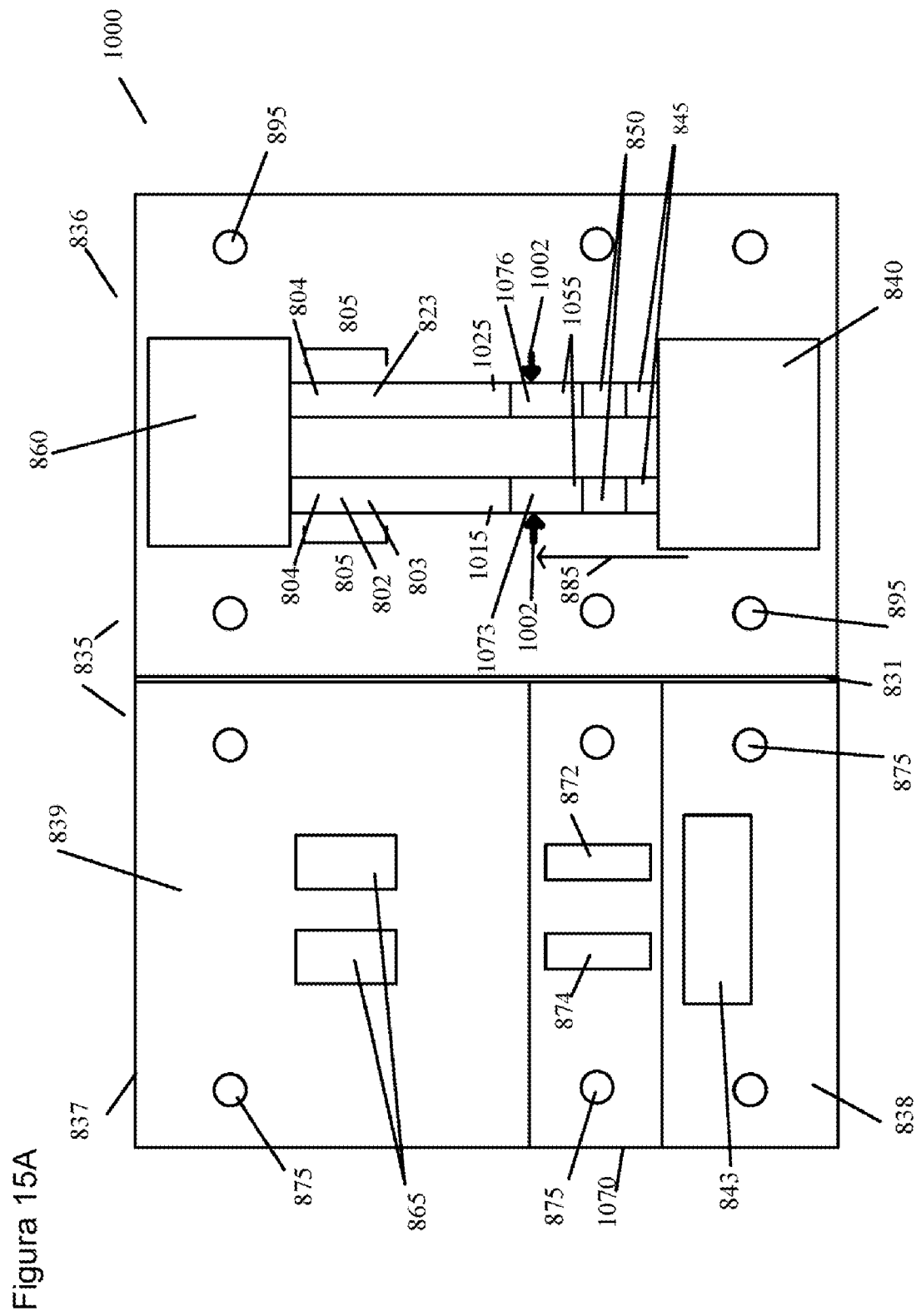


Figura 15B

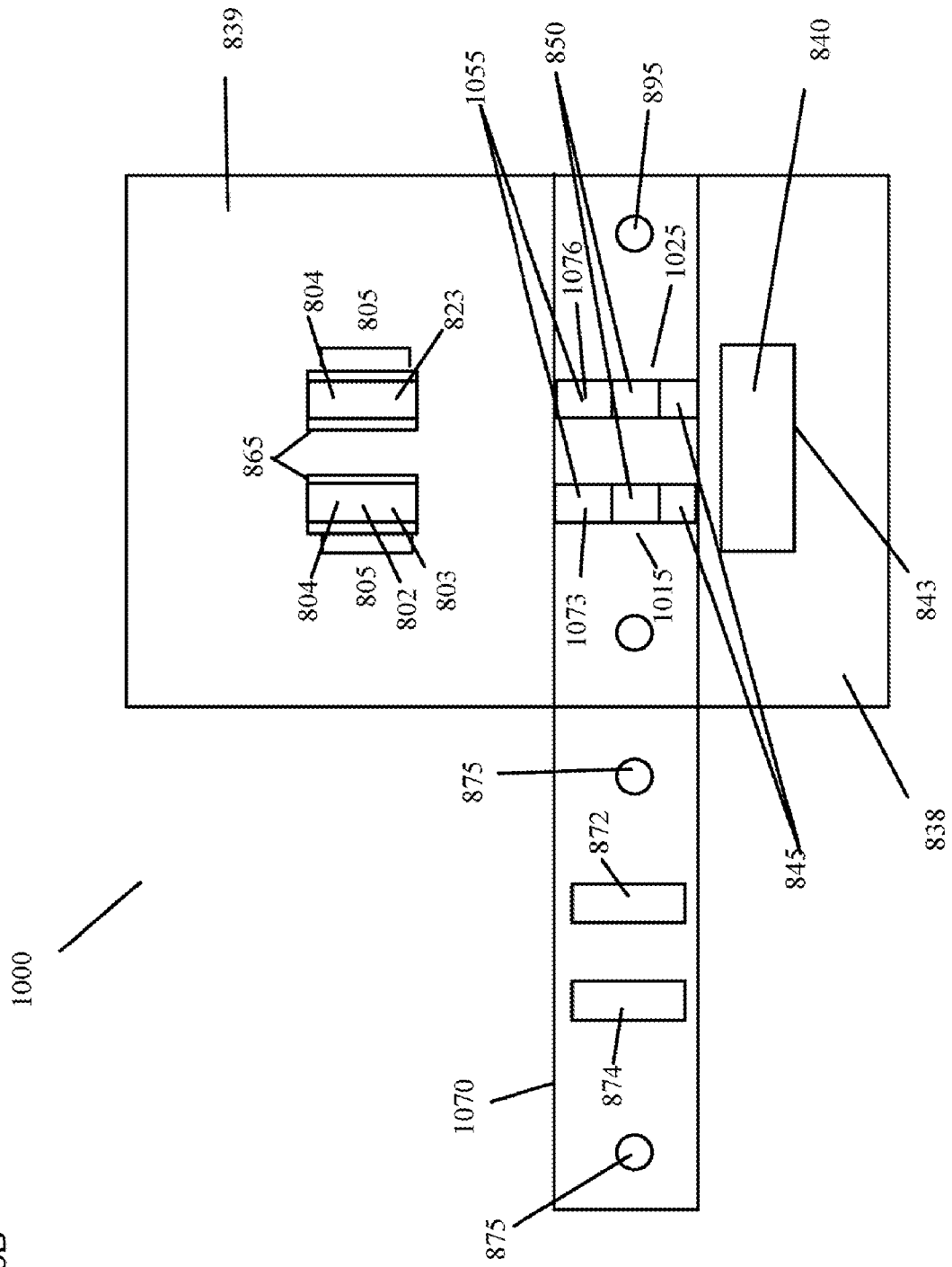
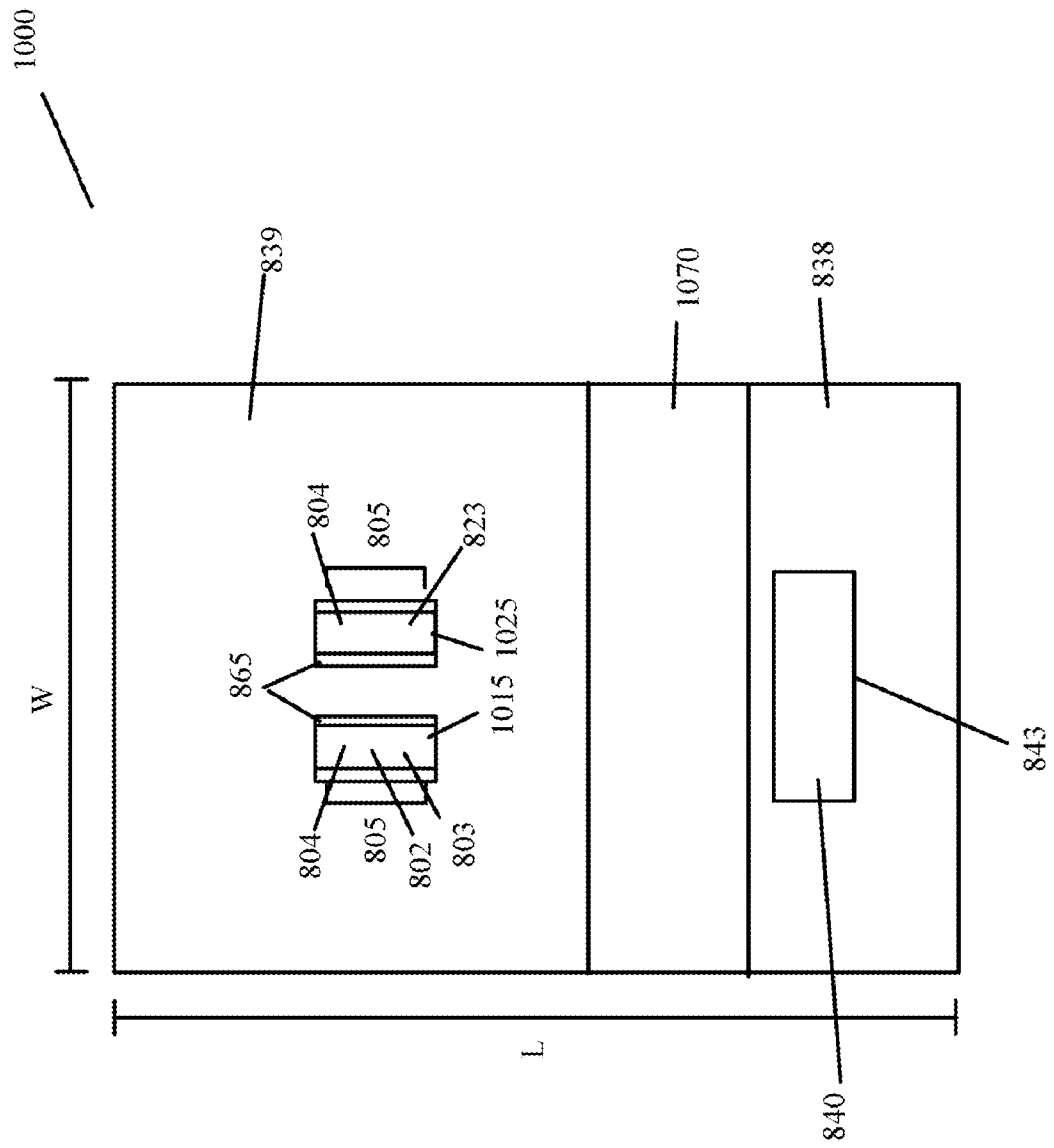




Figura 15C



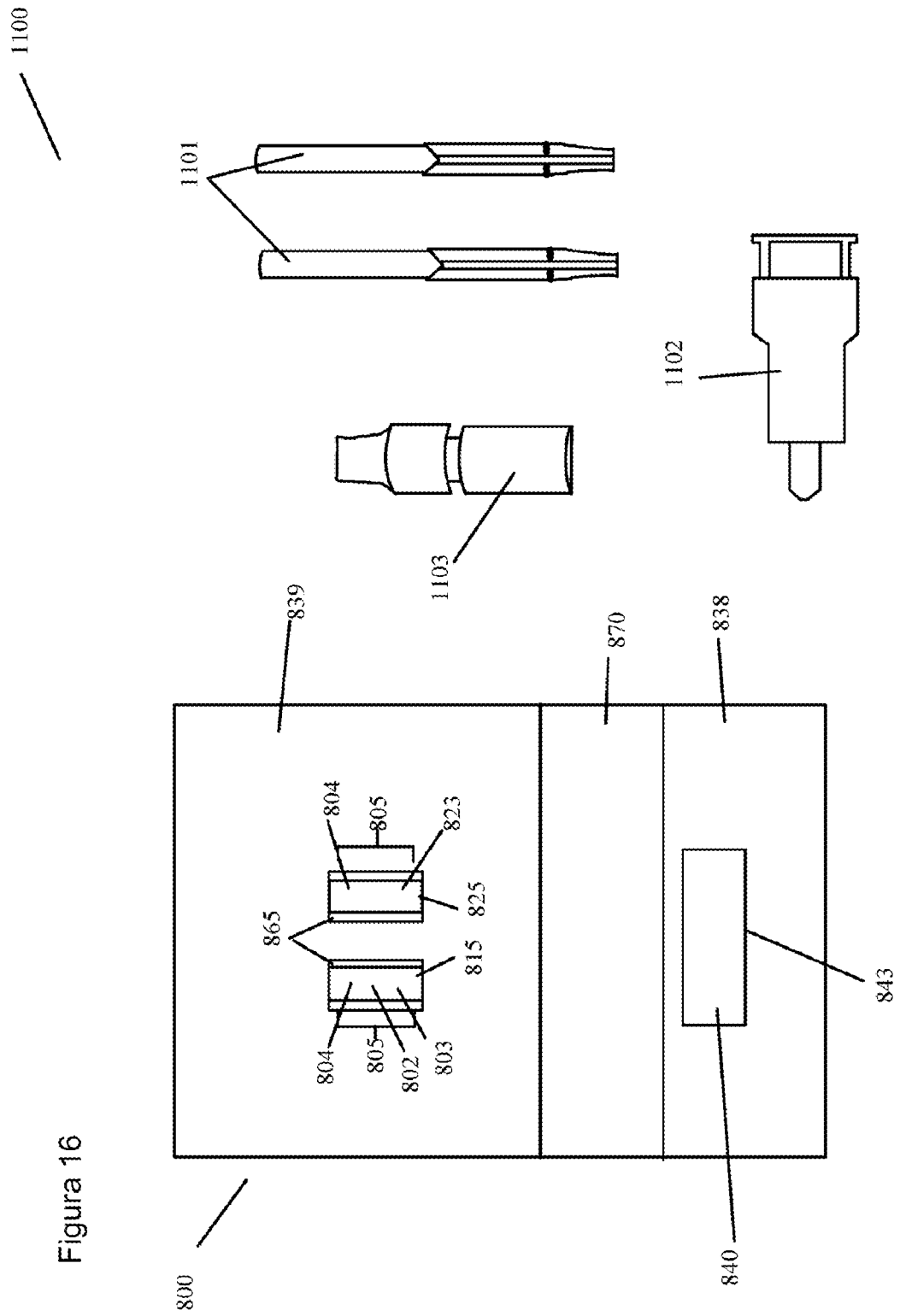
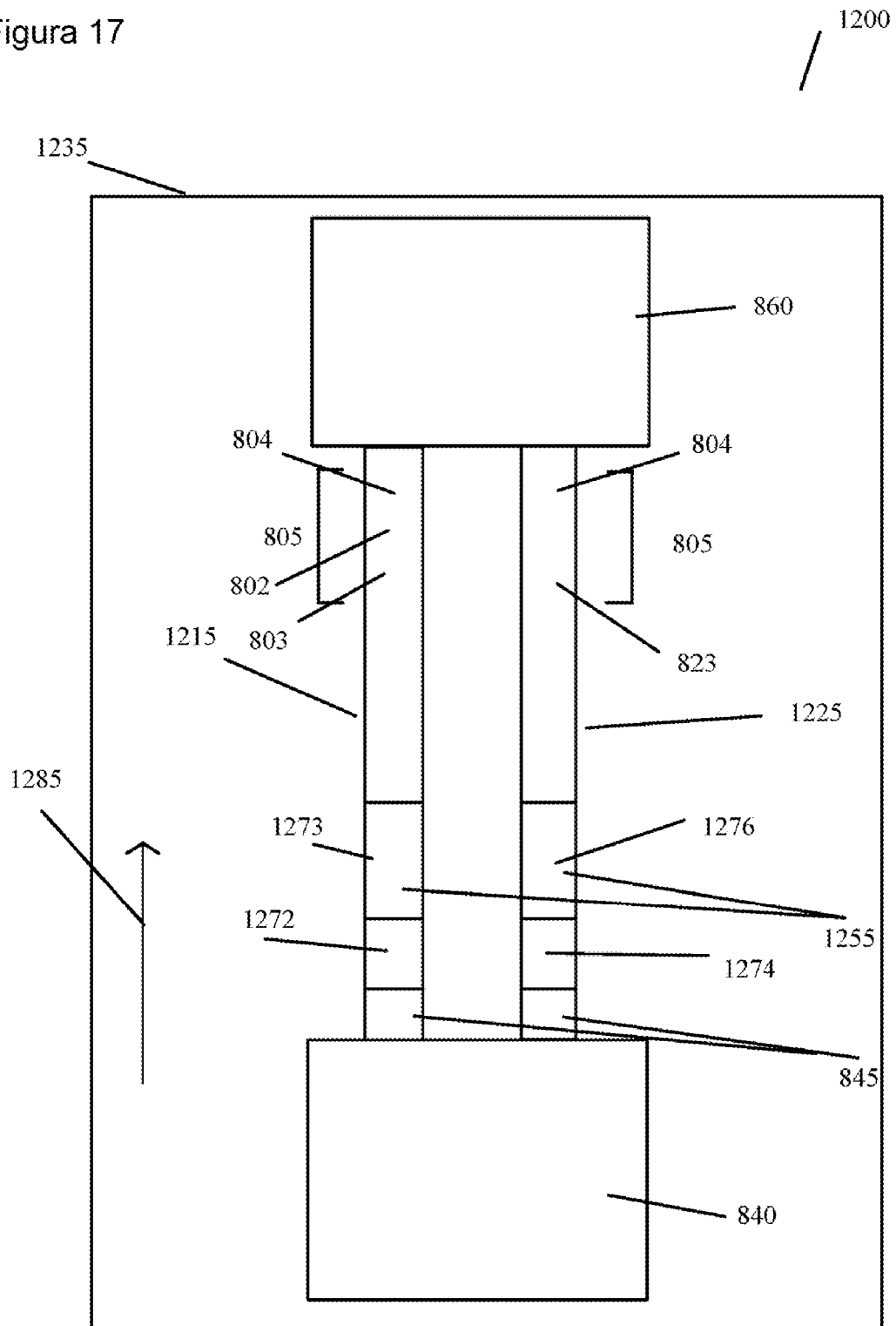


Figure 16

Figura 17



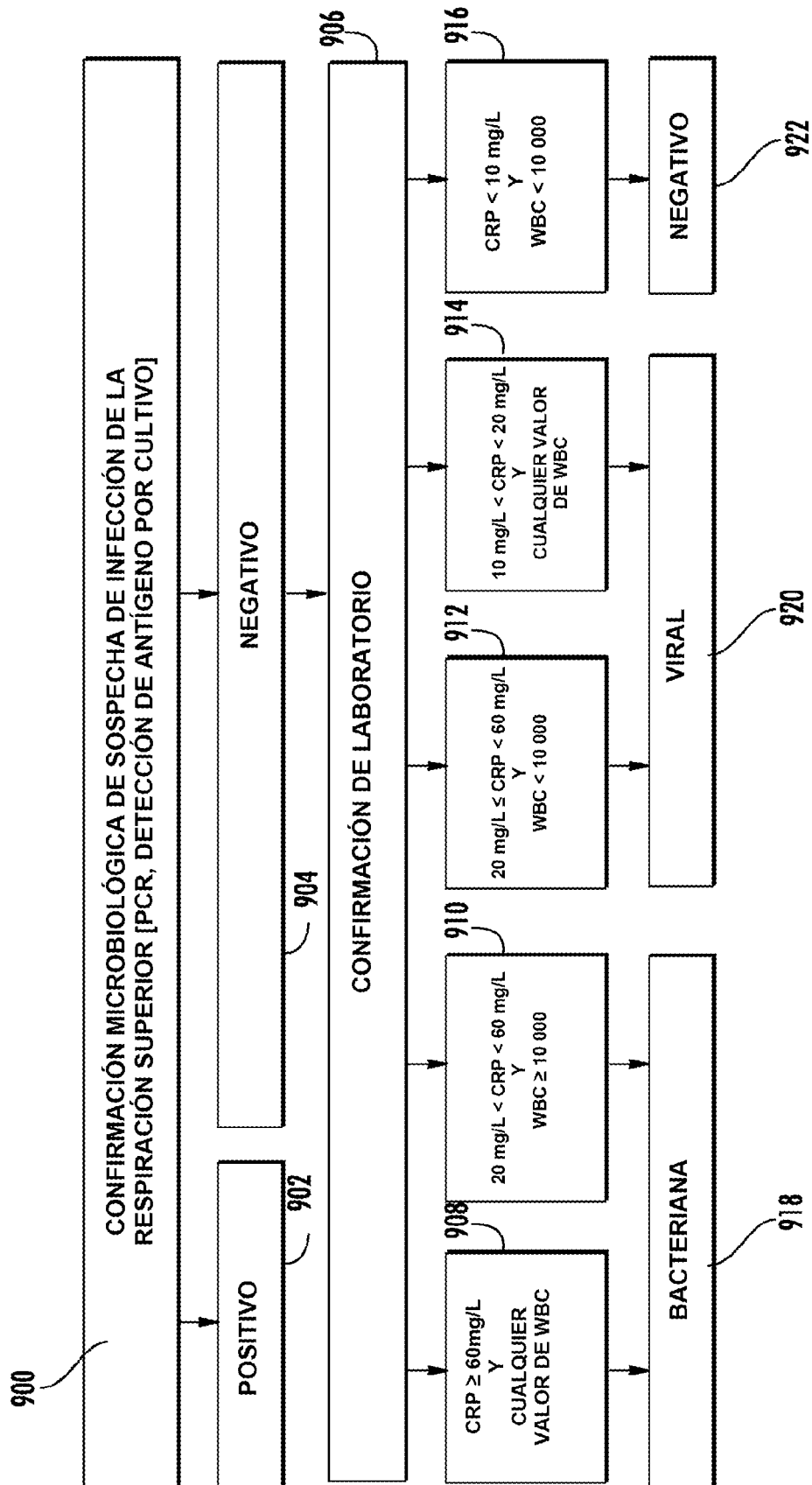


Figura 18

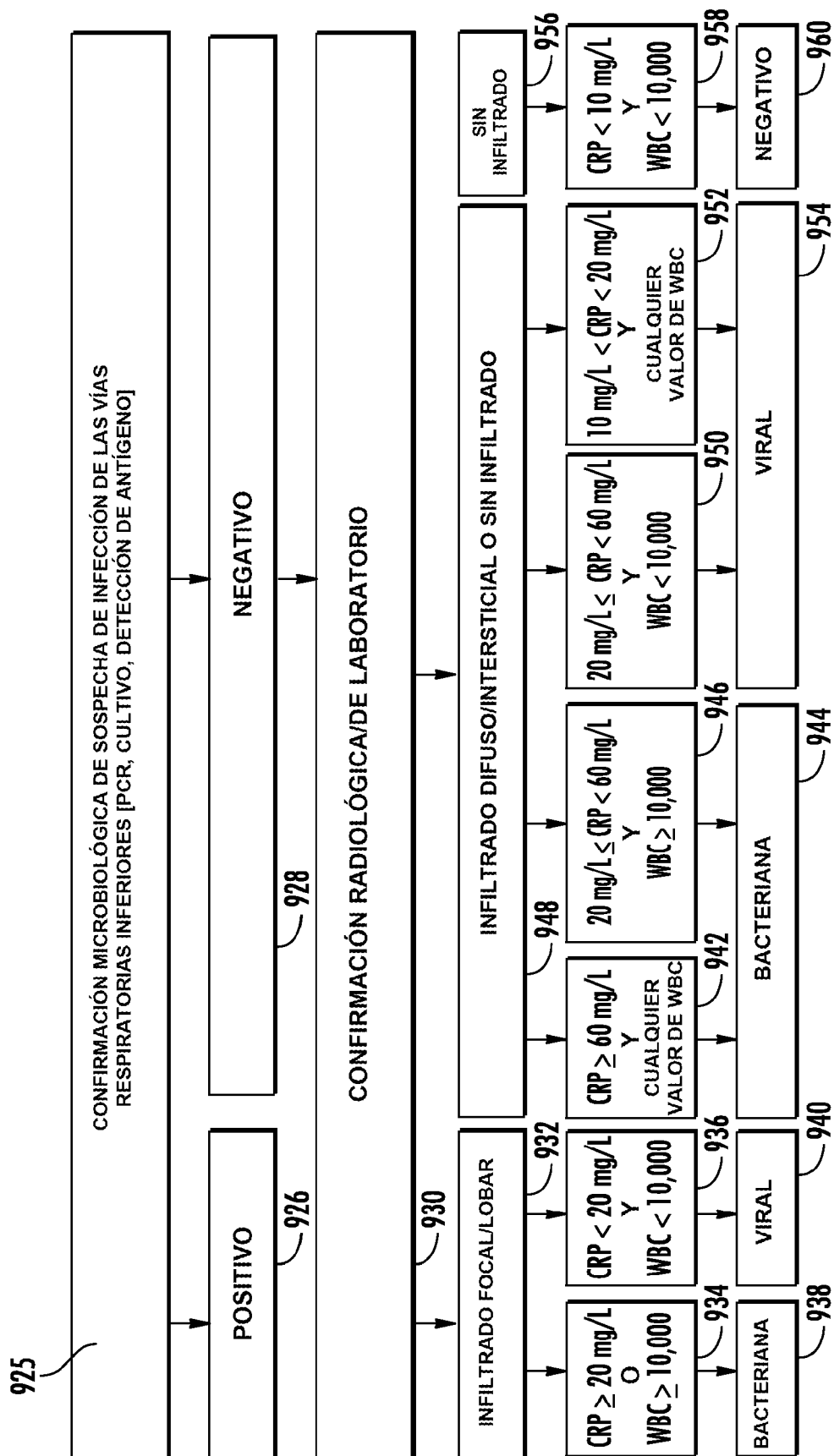


Figura 19

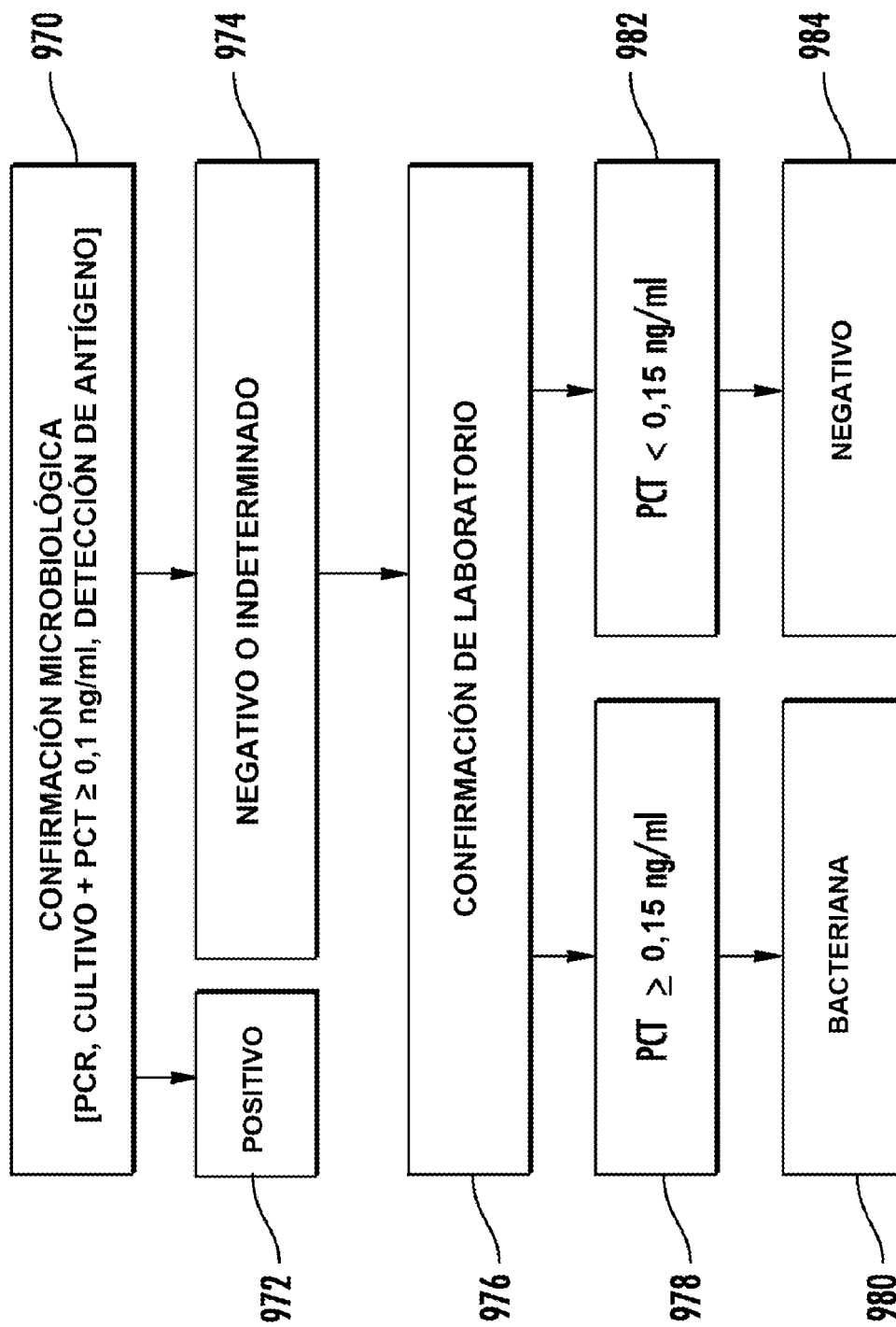
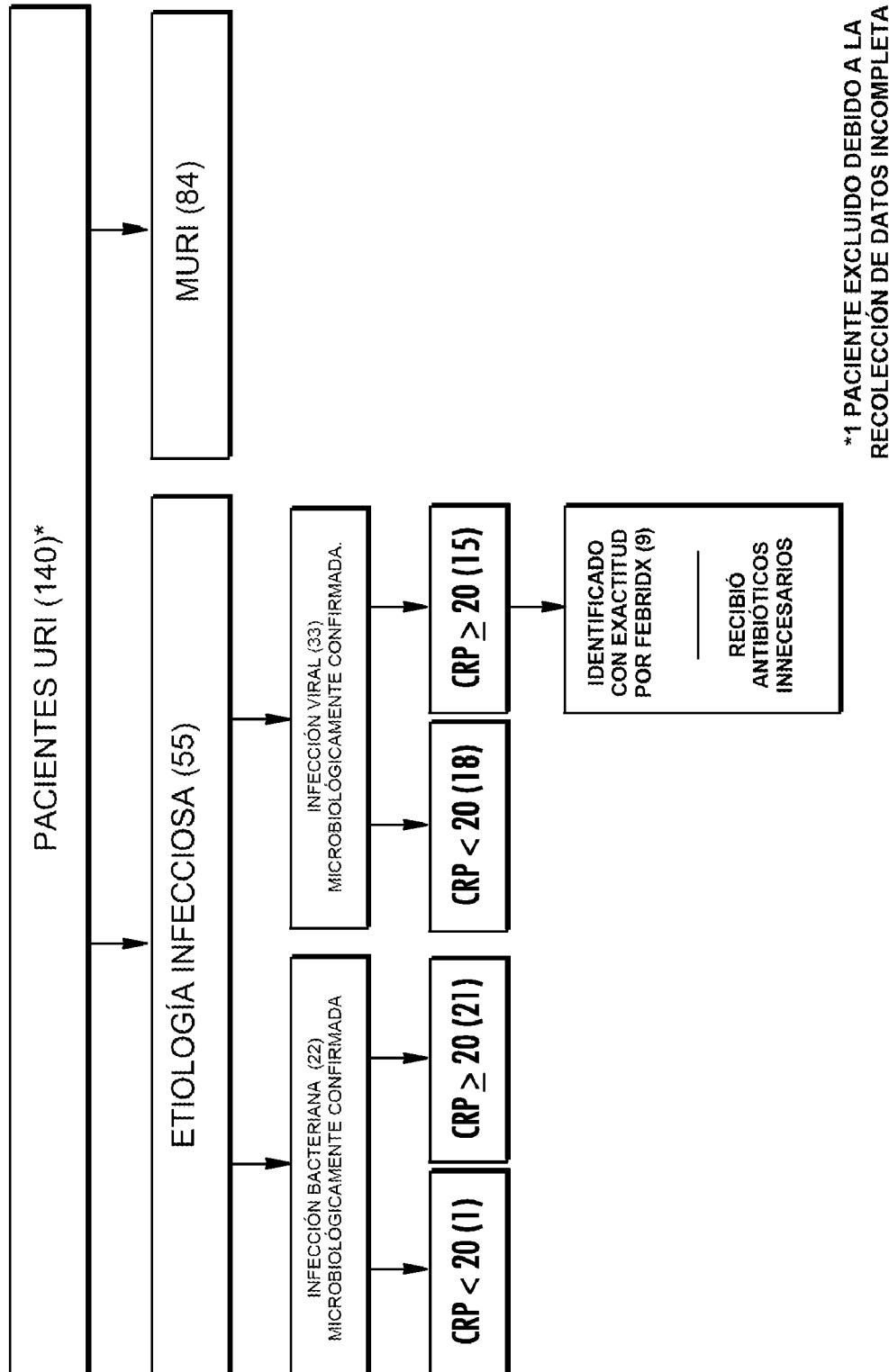


Figura 20



\*1 PACIENTE EXCLUIDO DEBIDO A LA RECOLECCIÓN DE DATOS INCOMPLETA

Figura 21

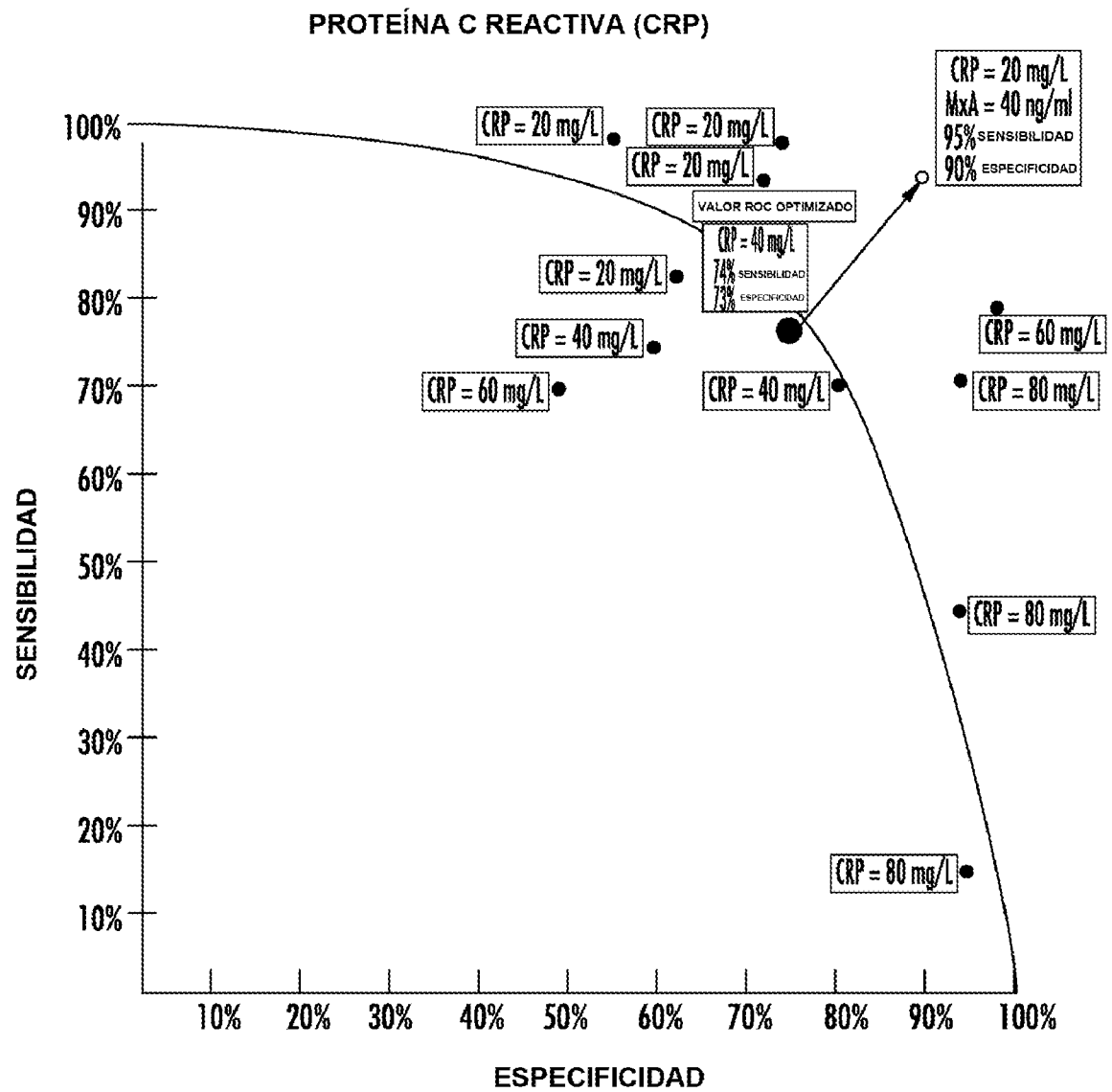


Figura 22



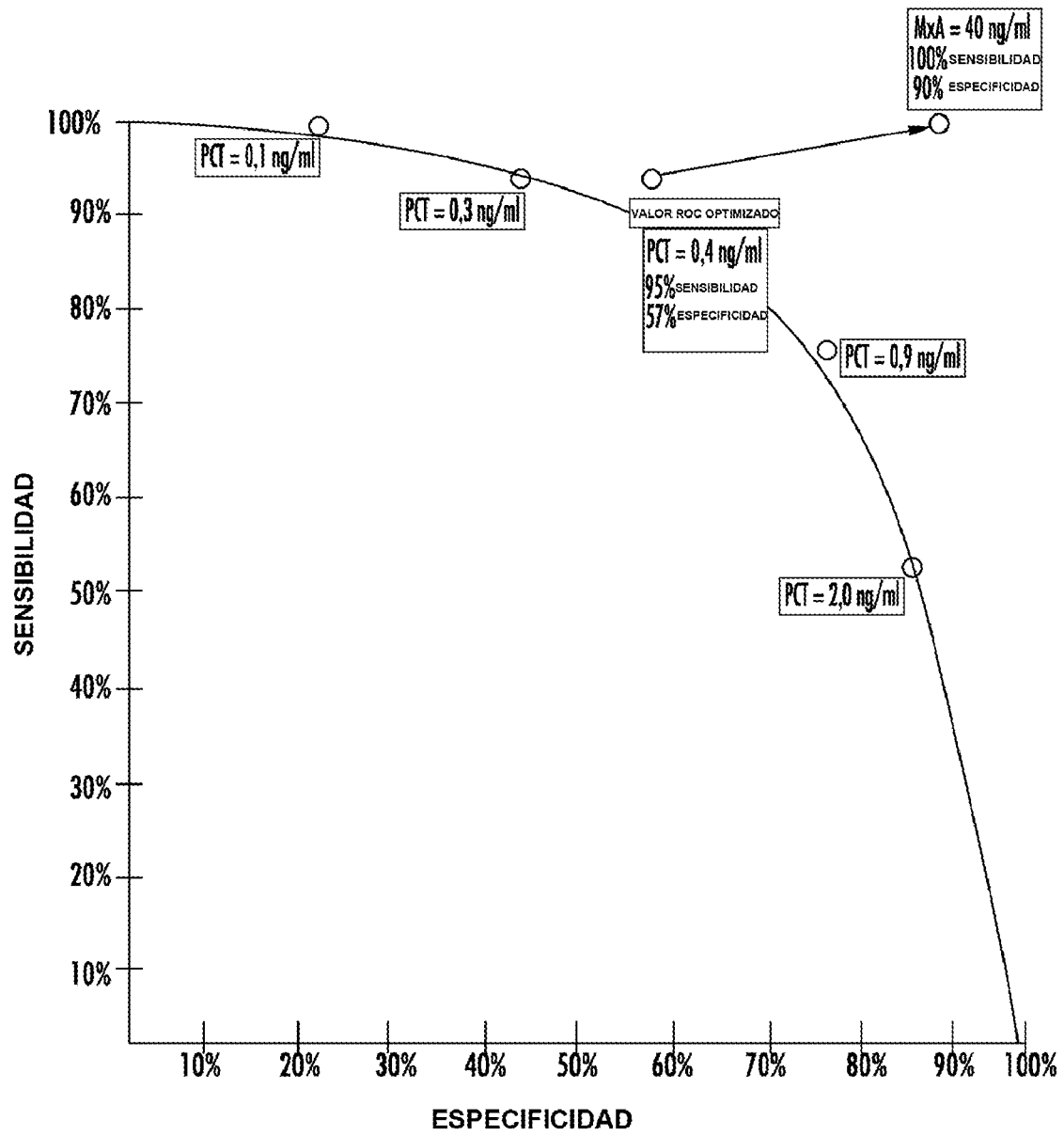


Figura 23