

MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DEL DENGUE

DESCRIPCIÓN

5 El proyecto que ha llevado a esta solicitud de Patente ha recibido financiación del programa de investigación e innovación de la Unión Europea Horizonte 2020 bajo el acuerdo de beca Marie Skłodowska-Curie Num. 645758.

Campo de la invención

10

La presente invención se refiere al sector de la biomedicina, más preferentemente al sector del diagnóstico biomédico. Más concretamente, la presente invención se refiere a métodos y procedimientos para el diagnóstico rápido y fiable del dengue y a test y kits para llevar a cabo dichos métodos y procedimientos.

15

Antecedentes de la invención

El dengue es una infección vírica, transmitida por mosquitos (principalmente de la especie *Aedes aegypti* y, en menor grado, de *Aedes albopictus*), que produce un
20 síndrome pseudogripal grave y en ocasiones puede derivar en un cuadro potencialmente mortal conocido como dengue grave. Actualmente se estima que se producen entre 50 y 100 millones de infecciones cada año en los más de 100 países en los que el dengue es endémico (el dengue, normalmente, se presenta en los climas tropicales y subtropicales de todo el planeta), lo que supone un riesgo de infección para
25 prácticamente la mitad de la población mundial.

Se conocen cuatro serotipos distintos, pero estrechamente emparentados, del virus del dengue: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. Cuando una persona se recupera de la infección adquiere inmunidad de por vida contra el serotipo en particular. Sin embargo,
30 la inmunidad cruzada a los otros serotipos es parcial y temporal. Las infecciones posteriores causadas por otros serotipos aumentan el riesgo de padecer el dengue grave.

Entre las características patológicas y/o sintomatológicas a destacar del dengue serían:
35

- Es una enfermedad de tipo gripal que afecta a bebés, niños pequeños y adultos, pero raras veces resulta mortal.
- Los síntomas se presentan al cabo de un periodo de incubación de 4 a 10 días después de la picadura de un mosquito infectado y por lo común duran entre 2 y 7 días.
- Se debe sospechar que una persona padece dengue cuando una fiebre elevada (40 °C) se acompaña de dos de los síntomas siguientes: dolor de cabeza muy intenso, dolor detrás de los globos oculares, dolores musculares y articulares, náuseas, vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos o salpullido.

10

El dengue grave (conocido anteriormente como dengue hemorrágico) fue identificado por vez primera en los años cincuenta del siglo pasado durante una epidemia de la enfermedad en Filipinas y Tailandia. Hoy en día, afecta a la mayor parte de los países de Asia y América Latina y se ha convertido en una de las causas principales de hospitalización y muerte en los niños y adultos de dichas regiones. Dicho dengue grave es una complicación potencialmente mortal porque cursa con extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves o falla orgánica. Los signos que advierten de esta complicación se presentan entre 3 y 7 días después de los primeros síntomas y se acompañan de un descenso de la temperatura corporal (menos de 38 °C) y los siguientes síntomas: dolor abdominal intenso, vómitos persistentes, respiración acelerada, hemorragias de las encías, fatiga, inquietud y presencia de sangre en el vómito. Las siguientes 24 a 48 horas de la etapa crítica pueden ser letales; y, por tanto, hay que brindar atención médica para evitar otras complicaciones y disminuir el riesgo de muerte.

25

Actualmente, no hay tratamiento específico del dengue ni del dengue grave, pero la detección pronta y oportuna y el acceso a la asistencia médica adecuada disminuyen las tasas de mortalidad por debajo del 1%, por lo cual el desarrollo de métodos, test y/o kits de diagnóstico precoz para dengue, rápidos, eficaces y, además, fáciles de realizar e interpretar (por ejemplo, por el mismo enfermo incluso en su propio domicilio), mejoraría considerablemente el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad y, por tanto, resulta altamente deseable.

Por el momento, en el estado de la técnica se encuentran métodos, test y kits de diagnóstico basado en la detección de partes del virus (proteínas o ácidos nucleicos) o

35

de la respuesta inmune del paciente. Por tanto, se trata de métodos complicados, largos, laboriosos y que requieren de personal especializado para su realización (es decir, no los puede llevar a cabo el propio paciente). Otro problema existente en el estado de la técnica es el daño o molestias causados al paciente en la obtención de la muestra que,
5 normalmente, en el estado de la técnica, es la sangre.

Por tanto, en el estado de la técnica sigue existiendo la necesidad y resultaría deseable disponer de métodos para el diagnóstico del dengue rápidos y fiables. Adicionalmente, también existe la necesidad de disponer de métodos de diagnóstico de dicha
10 enfermedad que no supongan una molestia para el paciente (por ejemplo, durante la toma de la muestra). De esta manera, se podría obtener un diagnóstico más temprano o precoz y fiable de la enfermedad permitiendo iniciar antes el seguimiento y/o tratamiento de los enfermos y, reduciendo, por tanto, los riesgos de complicaciones y la mortalidad asociada a la enfermedad. En el estado de la técnica, también existe la
15 necesidad de disponer de métodos para el diagnóstico de dengue que sean fáciles de llevar a cabo y de interpretar y que, por tanto, se puedan llevar a cabo en el domicilio del propio paciente, en centros de atención primaria y/o en farmacias.

Los inventores de la presente invención, tras extensos y exhaustivos experimentos, han
20 descubierto métodos para el diagnóstico de dengue basados en la utilización de muestras de exhalado. Los métodos para el diagnóstico del dengue desarrollados por los presentes inventores han demostrado permitir un diagnóstico rápido, fiable, sensible y precoz del dengue. Adicionalmente, la muestra utilizada permite no causar molestias al paciente durante su obtención. En algunas realizaciones, además, los métodos para
25 el diagnóstico de dengue descubiertos por los presentes inventores son fáciles de realizar y de interpretar, permitiendo su realización en el domicilio del propio individuo que sospecha que padece dengue, en centros de atención primaria y/o en farmacias. Adicionalmente, los inventores de la presente invención también han desarrollado test y kits para la implementación y la realización de los métodos para el diagnóstico de
30 dengue de la presente invención. Por tanto, los inventores, con la presente invención logran resolver los problemas presentes en el estado de la técnica mencionados anteriormente.

Descripción de la invención

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de dengue caracterizado porque comprende la detección de al menos un compuesto orgánico volátil en una muestra de exhalado o aliento.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de una muestra de exhalado o aliento para el diagnóstico de dengue.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto orgánico volátil para el diagnóstico de dengue.

En un aspecto final, la presente invención se refiere a test o kits para llevar a cabo los métodos para el diagnóstico de dengue de la presente invención.

En el presente documento, “exhalado”, “aliento” y sus plurales se utilizan de forma intercambiable y se refieren al aire que se expulsa al respirar o exhalar.

Por tanto, tal y como se ha mencionado anteriormente, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de dengue caracterizado porque comprende la detección de al menos un compuesto orgánico volátil en una muestra de exhalado.

El presente método de diagnóstico es un método in vitro.

En el método para el diagnóstico de dengue de la presente invención la muestra de exhalado es de un sujeto, preferentemente, de un mamífero, más preferentemente, de un humano.

La muestra de exhalado se contempla que sea recogida u obtenida por cualquiera de los procedimientos o métodos conocidos en el estado de la técnica ahora o en el futuro y, por tanto, utilizando, en los casos en los que sea necesario, cualquiera de los dispositivos conocidos en el estado de la técnica ahora o en el futuro. En una realización preferente, la muestra de exhalado se recoge con un dispositivo de recogida de muestras de exhalado conocido en el estado de la técnica, tales como, Bio-VOC (Markes

International Ltd, Reino Unido); la bolsa Tedlar (SKC Inc., PA, Estados Unidos) y/o la bolsa Mylar (Quintron, Milwaukee, WI, Estados Unidos), aún más preferentemente la muestra de exhalado se recoge con un dispositivo Bio-VOC (Markes International Ltd, Reino Unido).

5

Se contempla que la muestra de exhalado recogida u obtenida de acuerdo a lo indicado anteriormente, sea utilizada tal cual se ha recogido, es decir, sin aplicarle ningún tratamiento previo (sin aplicar ninguna etapa de pretratamiento). Alternativamente, también se contempla que la muestra de exhalado recogida u obtenida de acuerdo a lo
10 indicado anteriormente, sea pretratada por medio de una o varias de: una etapa de filtrado, una etapa de preconcentración, una etapa de condensación y/o una etapa de deshumidificación, más preferentemente una etapa de filtrado, una etapa de preconcentración y/o una etapa de deshumidificación. En una realización preferente, a la muestra de exhalado se le aplica una etapa de preconcentración. En dicha etapa de
15 preconcentración, la muestra de exhalado preferentemente es transferida a un tubo preconcentrador de compuestos orgánicos volátiles. Dicho tubo preconcentrador de compuestos orgánicos volátiles puede ser cualquiera de los conocidos en el estado de la técnica. Dicho tubo preconcentrador de compuestos orgánicos volátiles generalmente comprende un material absorbente. En una realización preferente el tubo
20 preconcentrador comprende como material absorbente Tenax TA (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos).

En una primera realización del método para el diagnóstico de dengue de la presente invención, el al menos un compuesto orgánico volátil (COV) a detectar en la muestra de
25 exhalado es COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 07, COV 08, COV 09, COV 10 o combinaciones de los mismos, donde dichos compuestos orgánicos volátiles presentan las características indicadas en la tabla 1 en cromatografía de gases acoplada a cuadrupolo de tiempo de vuelo (en adelante, GC/Q-TOF, por sus siglas en inglés):

30

Tabla 1. Características de los compuestos orgánicos volátiles en GC/Q-TOF.

Compuesto orgánico volátil	m/z	Tiempo de retención (minutos)
COV 01	63,02318	2,932
COV 02	104,06307	3,253
COV 03	73,04636	3,276

Compuesto orgánico volátil	m/z	Tiempo de retención (minutos)
COV 04	91,05716	3,298
COV 05	91,05582	4,037
COV 06	43,05463	6,024
COV 07	67,05393	6,107
COV 08	159,11653	9,646
COV 09	161,1329	10,134
COV 10	161,13213	10,309

Los compuestos específicos asignados a los compuestos orgánicos volátiles mencionados anteriormente (tabla 1) son los indicados en la tabla 2:

- 5 Tabla 2. Compuestos específicos asignados a cada uno de los compuestos orgánicos volátiles en función de sus características en GC/Q-TOF.

Compuesto orgánico volátil	Compuesto
COV 01	etilbenceno
COV 02	estireno
COV 03	n-propil acrilato
COV 04	Ácido fórmico, 2-feniletilester
COV 05	tolueno
COV 06	linalool
COV 07	1-undecina
COV 08	7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona
COV 09	1H-benzotriazol, 1-acetil
COV 10	2-etilsulfoniletanol

- Se contempla que los compuestos orgánicos volátiles puedan ser otros diferentes que presenten una estructura parecida o equivalente a los indicados en la tabla 2; o que tengan una masa/carga (m/z) y un tiempo de retención similares a los indicados en la tabla 2.
- 10

- Por tanto, preferentemente, el al menos un compuesto orgánico volátil a medir en el método para el diagnóstico de la presente invención es etilbenceno; estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno; linalool; 1-undecina; 7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona; 1H-benzotriazol, 1-acetil; 2-etilsulfoniletanol o
- 15

combinaciones de los mismos. Tal como se ha indicado anteriormente, también se contempla que los compuestos orgánicos volátiles a detectar puedan ser otros diferentes que presenten una estructura parecida o equivalente a los indicados anteriormente; o que tengan una masa/carga (m/z) y un tiempo de retención similares a los indicados anteriormente.

Se contempla que en el método para el diagnóstico de dengue de la presente invención el al menos un compuesto orgánico volátil a detectar o medir en la muestra de exhalado sea un compuesto orgánico volátil. En la realización más preferente, en el método para el diagnóstico de dengue de la presente invención el al menos un compuesto orgánico volátil a detectar o medir en la muestra de exhalado es una combinación de compuestos orgánicos volátiles (es decir, al menos dos compuestos orgánicos volátiles). Más preferentemente, dicha combinación de compuestos orgánicos volátiles a detectar o medir en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:

- COV 04, COV 06.
- COV 05, COV 07, COV 09.
- COV 03, COV 04, COV 06.
- COV 02, COV 03, COV 04, COV 05.
- COV 03, COV 04, COV 08, COV 09.
- COV 04, COV 07, COV 08, COV 09.
- COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 07.
- COV 01, COV 04, COV 07, COV 08, COV 10.
- COV 03, COV 04, COV 07, COV 08, COV 10.
- COV 02, COV 03, COV 04, COV 06, COV 07, COV 09.
- COV 01, COV 03, COV 04, COV 06, COV 09, COV 10.
- COV 03, COV 04, COV 07, COV 08, COV 09, COV 10.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 07; COV 10.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 06, COV 07, COV 09.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 07, COV 10.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 07, COV 09, COV 10.
- COV 01 a COV 10.

Aún más preferentemente, dicha combinación de compuestos orgánicos volátiles a

detectar o medir en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:

- COV 02, COV 03, COV 04, COV 05.
- COV 03, COV 04, COV 08, COV 09.
- 5 - COV 04, COV 07, COV 08, COV 09.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 07; COV 10.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 06, COV 07, COV 09.
- COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 07, COV 10.

10

Por tanto, más preferentemente, la combinación de compuestos orgánicos volátiles a detectar o medir en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:

- Ácido fórmico, 2-feniletilester; linalool.
- 15 - Tolueno; 1-undecina; 1H-benzotriazol, 1-acetil.
- n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; linalool;
- estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno.
- n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; 7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona; 1H-benzotriazol, 1-acetil.
- 20 - Ácido fórmico, 2-feniletilester; 1-undecina; 7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona; 1H-benzotriazol, 1-acetil.
- estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno; 1-undecina.
- Etilbenceno; ácido fórmico, 2-feniletilester; 1-undecina; 7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona; 2-etilsulfonietanol.
- 25 - n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; 1-undecina; 7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona; 2-etilsulfonietanol.
- Estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; linalool; 1-undecina; 1H-benzotriazol, 1-acetil.
- Etilbenceno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; linalool; 1H-benzotriazol, 1-acetil; 2-etilsulfonietanol
- 30 - n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; 1-undecina; 7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona; 1H-benzotriazol, 1-acetil; 2-etilsulfonietanol.
- Etilbenceno; estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno; 1-undecina; 2-etilsulfonietanol.
- 35 - Etilbenceno; estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; linalool; 1-

- undecina; 1H-benzotriazol, 1-acetil.
- Etilbenceno; estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno; linalool; 1-undecina; 2-etilsulfoniletanol.
 - Etilbenceno; estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno; linalool; 1-undecina; 1H-benzotriazol, 1-acetil; 2-etilsulfoniletanol.
 - Etilbenceno; estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno; linalool; 1-undecina; 7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona; 1H-benzotriazol, 1-acetil; 2-etilsulfoniletanol.
- 5
- 10 Aún más preferentemente, la combinación de compuestos orgánicos volátiles a detectar o medir en la muestra de exhalado es cualquiera de las siguientes:
- estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno.
 - n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; 7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona; 1H-benzotriazol, 1-acetil.
 - Ácido fórmico, 2-feniletilester; 1-undecina; 7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona; 1H-benzotriazol, 1-acetil.
 - Etilbenceno; estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno; 1-undecina; 2-etilsulfoniletanol.
- 15
- Etilbenceno; estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; linalool; 1-undecina; 1H-benzotriazol, 1-acetil.
 - Etilbenceno; estireno; n-propil acrilato; ácido fórmico, 2-feniletilester; tolueno; linalool; 1-undecina; 2-etilsulfoniletanol.
- 20
- 25 En esta primera realización del método para el diagnóstico de dengue de la presente invención, se contempla que la muestra de exhalado (obtenida y procesada de acuerdo a lo indicado anteriormente), sea analizada de acuerdo a cualquiera de los procedimientos y/o métodos disponibles en el estado de la técnica ahora o en el futuro para la detección de compuestos orgánicos volátiles. Preferentemente, la muestra de
- 30 exhalado se analiza por medio de cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (en adelante GC-MS, por sus siglas en inglés), GC/Q-TOF, cromatografía de gases bidimensional acoplada a espectroscopia de masas (en adelante GCxGC/MS, por sus siglas en inglés) y/o espectrometría de masas de reacción de transferencia de protones (en adelante PTR-MS, por sus siglas en inglés), más preferentemente, la
- 35 muestra de exhalado se analiza mediante GC/Q-TOF.

En una segunda realización del método para el diagnóstico de dengue de la presente invención, dicho método de diagnóstico se caracteriza porque la muestra de exhalado (obtenida y procesada de acuerdo a lo indicado anteriormente) se analiza para la
5 detección de al menos un compuesto orgánico volátil mediante un dispositivo que comprende al menos un sensor que, a su vez, comprende al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles, más preferentemente dicho al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles comprende o consiste en al menos un nanomaterial
10 funcionalizado y/o recubierto por al menos un compuesto orgánico.

Preferentemente, en esta realización del método para el diagnóstico de dengue de la presente invención la detección de al menos un compuesto orgánico volátil comprende las etapas de: exposición del al menos un sensor (preferentemente uno) a la muestra
15 de exhalado; y detección del cambio en al menos una de las propiedades del sensor, más preferentemente del cambio en al menos una de las propiedades del al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles (dicho material es de acuerdo a lo explicado anteriormente y a lo que se explicará a continuación).

20 Por tanto, en este caso, la utilización de los sensores mencionados anteriormente determina que no se detecta en la muestra de exhalado la cantidad o presencia de un único compuesto orgánico volátil o un grupo de compuestos orgánicos volátiles específico directamente sino que se detectan y analizan patrones o conjuntos de
25 compuestos orgánicos volátiles en la muestra, por medio del efecto que tienen dichos compuestos orgánicos volátiles sobre el sensor o combinación de sensores. Es decir, en este caso, el al menos un compuesto orgánico volátil se detecta de forma indirecta, detectando uno o más cambios en propiedades del sensor (más preferentemente del al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos
30 volátiles) que produce dicho al menos un compuesto orgánico volátil.

Preferentemente, el al menos un nanomaterial son nanopartículas de metal, más preferentemente son nanopartículas de cobre (en adelante, Cu), oro (en adelante, Au), platino (en adelante, Pt), paladio (en adelante, Pd), plata (en adelante, Ag), níquel (en
35 adelante, Ni), cobalto (en adelante, Co), aluminio (en adelante, Al) o combinaciones de

las mismas, aún más preferentemente son nanopartículas de Cu, Au, Pt o combinaciones de las mismas.

5 Se contempla que el al menos un compuesto orgánico que funcionaliza y/o recubre el al menos un nanomaterial (preferentemente, nanopartículas de metal, más preferentemente nanopartículas de Cu, Au, Pt, Pd, Ag, Ni, Co, Al o combinaciones de las mismas, aún más preferentemente nanopartículas de Cu, Au, Pt o combinaciones de las mismas), sea cualquier compuesto orgánico o combinación de compuestos orgánicos que reaccione química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles, 10 permitiendo, por tanto, su detección. Más preferentemente, el al menos un compuesto orgánico se selecciona de alquiltiols, ariltiols, alquilariltiols, alquiltiolatos, arenotiolatos, (γ-mercaptopropil)tri-metoxisilano, disulfuros de dialquilo o combinaciones de los mismos; aún más preferentemente, el al menos un compuesto orgánico se selecciona de 1-decanotiol, oleilamina, 11-mercaptoundecanol, 4-metoxi-α-toluentiol, ácido 11- 15 mercaptoundecanoico, 2-mercaptobenzoxazol o combinaciones de los mismos.

Más preferentemente, el al menos un sensor (preferentemente, un sensor) comprende:

- nanopartículas de Au funcionalizadas con 1-decanotiol;
- 20 - nanopartículas de Cu funcionalizadas con oleilamina;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico;
- nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol;
- nanopartículas de Pt funcionalizadas con 4-metoxi-α-toluentiol;
- 25 - o combinaciones de las mismas.

En la realización más preferente, el al menos un sensor (preferentemente, un sensor) comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol.

30 También resulta preferente utilizar una combinación de sensores (matriz de sensores), más preferentemente, al menos ocho sensores, aún más preferentemente ocho sensores. En este último caso, preferentemente los sensores son como sigue:

- un sensor que comprende nanopartículas de Au funcionalizadas con 1- 35 decanotiol, más preferentemente la resistencia de este sensor es de 2,2 MΩ;

- un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con oleilamina, más preferentemente la resistencia de este sensor es de 41 MΩ;
- un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol, más preferentemente la resistencia de este sensor es de 4,3 MΩ;
- un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con oleilamina, más preferentemente la resistencia de este sensor es de 7,8 MΩ;
- un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 11-mercaptoundecanol, más preferentemente la resistencia de este sensor es de 7,1 MΩ;
- un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico, más preferentemente la resistencia de este sensor es de 6,2 MΩ;
- un sensor que comprende nanopartículas de Cu funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol, más preferentemente la resistencia de este sensor es de 11,5 MΩ; y
- un sensor que comprende nanopartículas de Pt funcionalizadas con 4-metoxi-α-toluentiol, más preferentemente la resistencia de este sensor es de 0,5 MΩ.

De forma preferente, el al menos un sensor (preferentemente, un sensor) está hecho de silicio. Adicionalmente, también de forma preferente, el sensor tiene dos electrodos de oro que presentan una zona de separación entre ellos (preferentemente, de 15 μm) y en la que se deposita o coloca el al menos un material que reacciona química y/o físicamente con compuestos orgánicos volátiles (de acuerdo a lo explicado anteriormente).

Se contempla que el dispositivo mencionado anteriormente comprenda al menos un instrumento conocido (ahora o en el futuro) en el estado de la técnica y que permita medir el cambio de al menos una de las propiedades del al menos un sensor mencionado anteriormente. Dicho cambio, tal y como se ha mencionado anteriormente está provocado por la interacción con uno o más compuestos orgánicos volátiles de la muestra de exhalado. El dispositivo comprende, por ejemplo, uno o más de los siguientes instrumentos: instrumentos que miden resistencia, instrumentos que miden conductancia, instrumentos que miden capacitancia, instrumentos que miden impedancia, instrumentos que miden inductancia, instrumentos que miden corriente

continua, instrumentos que miden corriente alterna, instrumentos que miden frecuencia, instrumentos que miden masa, instrumentos que miden voltaje, instrumentos que miden fluorescencia, instrumentos que miden propiedades ópticas, instrumentos que miden quimioluminiscencia, instrumentos que miden fosforescencia, instrumentos que miden
5 piezoelectricidad, instrumentos que miden ondas acústicas, instrumentos que miden dos o más de las propiedades o variables indicadas anteriormente o combinaciones de los mismos, más preferentemente el dispositivo comprende uno o más instrumentos que miden corriente continua. En consecuencia, en la etapa de detección del cambio en al menos una de las propiedades del sensor mencionada anteriormente, se contempla que
10 la al menos una propiedad del sensor sea resistencia, conductancia, capacitancia, impedancia, inductancia, corriente continua, corriente alterna, frecuencia, masa, voltaje, fluorescencia, propiedades ópticas, quimioluminiscencia, fosforescencia, piezoelectricidad, ondas acústicas o combinaciones de las mismas, más preferentemente, la al menos una propiedad es corriente continua.

15 Por otro lado, se contempla que los métodos para el diagnóstico de dengue de la presente invención, tras las etapas mencionadas anteriormente, comprendan una etapa de análisis y comparación de los datos o resultados obtenidos. En dicha etapa se puede utilizar cualquier método de análisis de datos conocido (ahora o en el futuro) en el estado
20 de la técnica. En una realización preferente, el método para el diagnóstico de la presente invención comprende una etapa de análisis de datos en la que se utiliza un algoritmo de entrenamiento y reconocimiento de patrones seleccionado de entre: algoritmos de red neuronal artificial (en adelante ANN, por sus siglas en inglés), análisis de componentes principales (en adelante PCA, por sus siglas en inglés), perceptrón multicapa (en
25 adelante MLP, por sus siglas en inglés), red neuronal de regresión generalizada (en adelante GRNN por sus siglas en inglés), sistemas de inferencia difuso (en adelante FIS, por sus siglas en inglés), mapa auto-organizado (en adelante SOM, por sus siglas en inglés), función de base radial (en adelante RBF, por sus siglas en inglés), algoritmos genéticos (en adelante GAs, por sus siglas en inglés), sistemas neurodifusos (en
30 adelante NFS, por sus siglas en inglés), teoría de resonancia adaptativa (en adelante ART, por sus siglas en inglés), regresión de mínimos cuadrados parciales (en adelante PLS, por sus siglas en inglés), regresión lineal múltiple (en adelante MLR, por sus siglas en inglés), regresión de componentes principales (en adelante PCR, por sus siglas en inglés) o análisis de función discriminante (en adelante DFA, por sus siglas en inglés),
35 aún más preferentemente DFA o PCA.

Tras el análisis mencionado anteriormente o conjuntamente con dicho análisis se lleva a cabo una comparación de los resultados obtenidos con los obtenidos para un sujeto control o un grupo de sujetos control (individuos o sujetos que no presentan dengue) con el fin de determinar la presencia o ausencia de dengue en la muestra analizada. La presencia de diferencias significativas en la muestra exhalada analizada en relación con el sujeto control o un grupo de sujetos control determina la presencia de dengue y, por tanto, el diagnóstico del paciente como infectado con dengue. En una realización preferente, la comparación de los resultados obtenidos se lleva a cabo frente a un valor umbral obtenido para un grupo de sujetos control. La presencia de diferencias significativas respecto a este valor umbral determina la presencia de dengue y, por tanto, el diagnóstico del paciente como infectado con dengue. En la realización más preferente, el algoritmo de entrenamiento y reconocimiento de patrones mencionado anteriormente se entrena con los resultados obtenidos para muestras de un grupo de pacientes con dengue y de un grupo de control, y será dicho algoritmo entrenado el utilizado para determinar si una muestra debe ser diagnosticada como dengue o no (es decir, el algoritmo entrenado pasaría a incorporar el valor umbral mencionado anteriormente).

Finalmente, se contempla que en las dos realizaciones del método para el diagnóstico de dengue de la presente invención haya una etapa final de transmisión de los resultados al usuario. En caso de que el método para el diagnóstico de la presente invención comprenda una o más etapas de análisis y/o comparación de datos o resultados, también se contempla la presencia de una o más etapas intermedias de transmisión de los resultados al usuario. Dicha una o más etapas intermedias de transmisión de los resultados al usuario, mostrarían los resultados crudos (es decir, sin analizar y/o comparar) y/o parcialmente analizados y/o comparados. Se entiende que el usuario es la persona que está llevando a cabo el método para el diagnóstico de dengue de la presente invención. Dicha etapa final de transmisión de los resultados y/o dichas una o más etapas intermedias de transmisión de los resultados al usuario contemplan que los resultados sean transmitidos al usuario por cualquier medio conocido o contemplado (ahora o en el futuro) en el estado de la técnica, más preferentemente, los resultados se transmiten al usuario por medio de una pantalla o por medio de uno o varios sonidos o señales acústicas.

En los métodos para el diagnóstico de dengue de la presente invención se contempla que los resultados sean obtenidos utilizando una unidad de procesamiento de datos debidamente configurada.

5 El método para el diagnóstico de dengue de la presente invención permite solucionar los problemas presentes en el estado de la técnica mencionados anteriormente, es decir, permite proporcionar métodos para el diagnóstico de dengue rápidos y fiables, basados en muestras cuya obtención no supone una molestia o malestar para el paciente. Adicionalmente, la segunda de las realizaciones del método para el
10 diagnóstico de dengue de la presente invención permite, además, proporcionar métodos diagnósticos fáciles de llevar a cabo y de interpretar y que, por tanto, se pueden llevar a cabo en el domicilio del propio paciente, en centros de atención primaria y/o en farmacias, resolviendo otro de los problemas presentes en el estado de la técnica y mencionados anteriormente.

15

Por tanto, en una realización preferente, el método para el diagnóstico de dengue de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) recogida de la muestra de exhalado de un sujeto;
- 20 b) análisis de la muestra de exhalado recogida en la etapa a) para la detección de al menos un compuesto orgánico volátil;
- c) análisis y comparación de los resultados obtenidos en la etapa b) para determinar si el sujeto padece dengue; y
- d) transmisión de los resultados.

25

De forma opcional, entre las etapas a) y b) se puede llevar a cabo el pretratamiento de la muestra de exhalado recogida en la etapa a).

Todas las etapas son de acuerdo a lo explicado anteriormente.

30

En un segundo aspecto, tal y como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere al uso de una muestra de exhalado para el diagnóstico de dengue.

La muestra de exhalado, tal y como se ha mencionado anteriormente, es,
35 preferentemente, de un mamífero, más preferentemente, de un humano.

Adicionalmente, se contempla que la muestra de exhalado sea recogida y procesada o pretratada de acuerdo a lo indicado anteriormente para los métodos para el diagnóstico de dengue.

5

El uso de la presente invención, implica la detección de al menos un compuesto orgánico volátil en la muestra de exhalado. Dicha detección es de acuerdo a lo indicado para los métodos para el diagnóstico de dengue de la presente invención.

10 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto orgánico volátil para el diagnóstico de dengue.

En una realización preferente, el al menos un compuesto orgánico volátil se encuentra o detecta en una muestra de exhalado de un sujeto.

15

La muestra de exhalado de un sujeto, tal y como se ha mencionado anteriormente, es, preferentemente, de un mamífero, más preferentemente, de un humano.

20 Tanto el al menos un compuesto orgánico volátil como su detección es de acuerdo a lo explicado anteriormente para el método de diagnóstico de dengue de la presente invención.

En un último aspecto, la presente invención se refiere a test o kits adecuados para llevar a cabo los métodos diagnósticos de dengue de la presente invención.

25

Tal como resultará evidente, dichos test o kits comprenderán los reactivos y/o dispositivos necesarios para llevar a cabo los métodos para el diagnóstico de dengue de la presente invención.

30 Adicionalmente, se contempla que dichos test y kits comprendan instrucciones para llevar a cabo los métodos de diagnóstico de dengue de la presente invención.

Finalmente, se contempla que los medios de transmisión del resultado del test o kit (es decir, del resultado del método de diagnóstico de dengue de la presente invención)

35 estén comprendidos en el propio test o kit o sean ajenos al mismo (por ejemplo, pantalla

de ordenador). En una realización preferente los medios de transmisión están comprendidos en el propio test o kit y pueden ser cualquiera de los conocidos (ahora o en el futuro) en el estado de la técnica, más preferentemente son una pantalla o un sonido o señal acústica.

5

Para una mejor comprensión, la presente invención se describe en más detalle a continuación en referencia a la figura adjunta y a los siguientes ejemplos no limitativos.

La figura 1 muestra el modelo construido con las áreas cromatográficas obtenidas para los compuestos orgánicos volátiles VOC 01 a VOC 10 de acuerdo a una primera realización del método para el diagnóstico de dengue de la presente invención. El círculo situado a la izquierda en el gráfico señala todas las muestras del grupo control y el círculo situado a la derecha en el gráfico señala todas las muestras del grupo de pacientes con dengue. Por tanto se observa una separación total y clara entre ambos grupos de muestras. El eje de las x muestra la variable PC1 (referente a Componente Principal 1 calculado por PCA) y el eje de las y la variable PC2 (referente a Componente Principal 2 calculado por PCA).

10

15

Ejemplos

20

Ejemplo 1. Diagnóstico del dengue de acuerdo a una primera realización del método de la presente invención.

Se recogieron muestras de aliento de un grupo de pacientes diagnosticados con dengue (n=17) y de un grupo de personas sin dengue, que formaron el grupo control (n=16). Las muestras fueron recogidas en el Hospital Universitario Erasmo Meoz y en la Clínica Unipamplona, los dos de Cúcuta, Colombia. Los dos grupos (Dengue y Control) fueron, en la medida de lo posible, pareados por edad y género.

25

Las muestras de exhalado fueron recogidas con un dispositivo inerte homologado Bio-VOC (Markes International Ltd., Reino Unido).

30

A continuación, el exhalado fue transferido a unos tubos preconcentradores de compuestos orgánicos volátiles con material absorbente Tenax TA (Sigma-Aldrich, San

Luis, Misuri, Estados Unidos). Los tubos fueron, entonces, guardados en una nevera a 4°C hasta su análisis.

Las muestras, en este caso, fueron analizadas por GC/Q-TOF, y se utilizó la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME, por sus siglas en inglés) para introducir los compuestos orgánicos volátiles del exhalado en el GC/Q-TOF.

En el presente caso se analizaron una serie de compuestos orgánicos volátiles útiles para el diagnóstico de dengue (ver tabla 3), dichos compuestos se hallaron en concentraciones estadísticamente diferentes entre los dos grupos aplicando el t-test con el valor de $\alpha = 0,05$ (correspondiente al nivel de confianza de 95%).

Tabla 3. Listado de compuestos orgánicos volátiles analizados y sus características en GC/Q-TOF.

Compuesto orgánicos volátil	Compuesto	Número CAS	m/z	Tiempo de retención (minutos)
COV 01	etilbenceno	100-41-4	63,02318	2,932
COV 02	estireno	629-20-9	104,06307	3,253
COV 03	n-propil acrilato	100-42-5	73,04636	3,276
COV 04	Ácido fórmico, 2-feniletilester	104-62-1	91,05716	3,298
COV 05	tolueno	108-88-3	91,05582	4,037
COV 06	linalool	78-70-6	43,05463	6,024
COV 07	1-undecina	2243-98-3	67,05393	6,107
COV 08	7,8-dimetil-8-nitrobiciclo[4,3,1]decan-10-ona	129967-66-4	159,11653	9,646
COV 09	1H-benzotriazol, 1-acetil	1135-66-6	161,1329	10,134
COV 10	2-etilsulfoniletanol	513-12-2	161,13213	10,309

Se utilizaron las áreas cromatográficas de estos compuestos para la construcción de modelos de reconocimiento de patrones, y se aplicó el DFA para entrenar el modelo. Se construyeron diversos modelos con diversas combinaciones de compuestos orgánicos volátiles, cuya tasa de acierto, así como los valores de sensibilidad, especificidad, verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), estimados mediante la validación cruzada dejando uno fuera (o "leave-one-out") aparecen resumidos en la tabla 4.

- 5 Tabla 4. Combinaciones de compuestos orgánicos volátiles y su potencial diagnóstico. En esta tabla VP significa Verdaderos Positivos; VN significa Verdaderos Negativos; FP significa Falsos Positivos; y FN significa Falsos Negativos.

Número de combinación	Combinación de compuestos orgánicos volátiles	Tasa de acierto (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VP	VN	FP	FN
1	COV 04, COV 06	81,8	81,8	82,3	13	14	3	3
2	COV 05, COV 07, COV 09	84,8	75	94,1	12	16	1	4
3	COV 03, COV 04, COV 06	84,8	81,2	88,2	13	15	2	3
4	COV 02, COV 03, COV 04, COV 05	87,9	75	100	12	17	0	4
5	COV 03, COV 04, COV 08, COV 09	87,9	81,3	94,1	13	16	1	3
6	COV 04, COV 07, COV 08, COV 09	87,9	81,3	94,1	13	16	1	3
7	COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 07	84,8	68,8	100	11	17	0	5
8	COV 01, COV 04, COV 07, COV 08, COV 10	84,8	75	94,1	12	16	1	4
9	COV 03, COV 04, COV 07, COV 08, COV 10	84,8	81,2	88,2	13	15	2	3
10	COV 02, COV 03, COV 04, COV 06, COV 07, COV 09	84,8	75	94,1	12	16	1	4
11	COV 01, COV 03, COV 04, COV 06, COV 09, COV 10	84,8	81,2	88,2	13	15	2	3
12	COV 03, COV	84,8	81,2	88,2	13	15	2	3

Número de combinación	Combinación de compuestos orgánicos volátiles	Tasa de acierto (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VP	VN	FP	FN
	04, COV 07, COV 08, COV 09, COV 10							
13	COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 07, COV 10	87,9	81,3	94,1	13	16	1	3
14	COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 06, COV 07, COV 09	87,9	81,3	94,1	13	16	1	3
15	COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 07, COV 10	87,9	81,3	94,1	13	16	1	3
16	COV 01, COV 02, COV 03, COV 04, COV 05, COV 06, COV 07, COV 09, COV 10	84,9	75	94,1	12	16	1	4
17	COV 01 a COV 10	81,8	68,8	94,1	11	16	1	5

- Tal como se deriva de la tabla 4, las diferentes combinaciones probadas mostraron ser útiles en el diagnóstico de dengue, permitiendo discernir de forma efectiva entre pacientes con dengue e individuos sanos en relación con dicha enfermedad (grupo control). La mejor tasa de acierto que se obtuvo para las diferentes combinaciones probadas fue del 87,9 % (ver combinaciones 4, 5, 6, 13, 14 y 15). Dichas combinaciones 4, 5, 6, 13, 14 y 15 son las que muestran una combinación más favorable de sensibilidad y especificidad, y en consecuencia, una mejor tasa de acierto.
- 10 El análisis no supervisado PCA realizado con los valores de todos los compuestos orgánicos volátiles (combinación número 17 en la tabla 4) dio el gráfico de la figura 1, que, tal y como se puede observar mostró una excelente capacidad para la clasificación y diferenciación entre los pacientes con dengue y el grupo control.

Por tanto, el método diagnóstico de acuerdo a una primera realización de la presente invención es útil para el diagnóstico del dengue proporcionando un método rápido y eficaz que permite resolver los problemas presentes en el estado de la técnica y mencionados anteriormente y que utiliza una muestra que se obtiene por métodos no
5 invasivos.

Ejemplo 2. Diagnóstico del dengue de acuerdo a una segunda realización del método de la presente invención.

10 Se recogieron muestras de aliento de un grupo de pacientes diagnosticados con dengue (n=15) y de un grupo de personas sin dengue, que formaron el grupo control (n=13). Las muestras fueron recogidas en el Hospital Universitario Erasmo Meoz y en la Clínica Unipamplona, los dos de Cúcuta, Colombia. Los dos grupos (Dengue y Control) fueron, en la medida de lo posible, pareados por edad y género.

15 Las muestras de exhalado fueron recogidas con un dispositivo inerte homologado Bio-VOC (Markes International Ltd., Reino Unido).

A continuación, el exhalado fue transferido a unos tubos preconcentradores de
20 compuestos orgánicos volátiles con material absorbente Tenax TA (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos). Los tubos fueron, entonces, guardados en una nevera a 4°C hasta su análisis.

En este caso las muestras recogidas fueron analizadas con sensores de gases. Dichos
25 sensores fueron fabricados sobre silicio mediante técnicas de microprocesado. En este sentido, se definieron dos electrodos de oro paralelos, con una separación de 15 μm en la región del área activa del sensor. En esta región se depositó el material activo del sensor. Como material activo se depositaron nanopartículas de cobre (en adelante, CuNP), nanopartículas de oro (en adelante, AuNP) o nanopartículas de platino (en
30 adelante, PtNP) funcionalizadas con diversos compuestos orgánicos (ver tabla 5). Dicha fabricación, funcionalización y/o deposición se llevó a cabo de acuerdo con lo indicado en la patente española ES2566067B1.

Tabla 5. Características de los diferentes sensores probados.

Sensores	Nanomaterial	Compuesto orgánico de funcionalización	Resistencia (MΩ)
S1	AuNP	1-decanotiol	2,2
S2	CuNP	Oleilamina	41
S3	CuNP	11-mercaptoundecanol	4,3
S4	PtNP	4-metoxi- α -toluentiol	0,5
S5	CuNP	Ácido 11-mercaptoundecanoico	6,2
S6	CuNP	Oleilamina	7,8
S7	CuNP	11-mercaptoundecanol	7,1
S8	CuNP	2-mercaptobenzoxazol	11,5

- Los sensores fueron, entonces, colocados en una cámara de medidas cerrada herméticamente (en el presente caso, con unas dimensiones de: 70x35x30 mm³) fabricada para este propósito, provista de dos orificios: uno para la introducción de la muestra de exhalado y para realizar el vacío en la cámara de medidas antes de cada medida, y el otro para evacuar la muestra de exhalado.
- Para analizar el exhalado, el tubo preconcentrador mencionado anteriormente y almacenado a 4°C fue cortado con un cúter y el material absorbente fue vertido en un vial de vidrio de 20 ml que se cerró herméticamente con un tapón provisto con septum. El vial fue, entonces, introducido en un horno a 270 °C durante 10 minutos, lo que produjo la desorción de los compuestos orgánicos volátiles absorbidos por el material absorbente. Los compuestos orgánicos volátiles liberados formaron, por tanto, un espacio de cabeza encima del material absorbente en el interior del vial.
- Por medio de una jeringa, se cogieron 10 ml de muestra de los compuestos orgánicos volátiles del espacio de cabeza mencionado anteriormente (pinchando a través del septum), que fueron a su vez introducidos en la cámara de medidas que alberga los sensores de gases. El material sensible de los sensores interaccionó mediante reacciones químico-físicas con los compuestos orgánicos volátiles, lo que produjo un cambio en las propiedades del sensor (detectables).
- Antes de cada medida, se le hizo el vacío (300 mbar) a la cámara de medidas durante 5 minutos.

5 Durante la realización de las medidas, los sensores fueron alimentados sucesivamente a una tensión de 8 V durante 10 segundos, y se adquirió la corriente continua que pasó a través de cada sensor durante este período. Se obtuvo la corriente continua en diversos intervalos de tiempo, y estos datos se utilizaron para construir modelos de reconocimiento de patrones para el diagnóstico del dengue.

10 Para limpiar los sensores y la cámara de medidas, después de cada medida se pasó un flujo de aire sintético (1L/min) por la cámara de medidas durante 30 minutos, estando los sensores alimentados sucesivamente a una tensión de 10V durante 10 segundos.

Se construyeron diversos modelos con la corriente continua adquirida en distintos intervalos de tiempo para un mismo sensor, y se aplicó el algoritmo DFA para entrenar los modelos. La tasa de acierto, así como los valores de sensibilidad, especificidad, verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), estimados mediante la validación cruzada dejando uno fuera (o “leave-one-out”) obtenidos para los diferentes sensores estudiados aparecen resumidos en la tabla 6.

20 Tabla 6. Potencial diagnóstico de cada uno de los sensores analizados. En esta tabla VP significa Verdaderos Positivos; VN significa Verdaderos Negativos; FP significa Falsos Positivos; y FN significa Falsos Negativos.

Parámetros	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
TP	14	14	14	13	14	12	14	13
TN	12	12	11	11	12	11	13	11
FP	1	1	2	2	1	2	0	2
FN	1	1	1	2	1	3	1	2
Tasa de acierto (%)	92,9	92,9	89,3	85,7	92,9	82,1	96,4	85,7
Especificidad (%)	92,3	92,3	84,6	84,6	92,3	84,6	100	84,6
Sensibilidad (%)	93,3	93,3	93,3	86,7	93,3	80	93,3	86,7

25 Dependiendo del sensor, se obtuvieron tasas de acierto que variaron entre 82,1% (ver S6) y 96,4% (ver S7).

Utilizando la combinación de las respuestas de los 8 sensores mencionados en la tabla 5, la tasa de acierto, la sensibilidad y la especificidad fueron de 100%.

Por tanto, el método diagnóstico de acuerdo a una segunda realización de la presente invención es útil para el diagnóstico del dengue proporcionando un método sencillo, rápido y eficaz que permite resolver los problemas presentes en el estado de la técnica y mencionados anteriormente. Adicionalmente, resulta destacable que en este caso, los
5 diferentes sensores probados obtuvieron una mayor tasa de acierto en comparación con las diferentes alternativas o combinaciones probadas respecto a una primera realización del método diagnóstico de la presente invención en el ejemplo 1. También resultan sorprendentes los resultados obtenidos para el sensor S7, que ha mostrado ser muy
10 superior al resto de sensores permitiendo el diagnóstico del dengue, en la población de estudio, con una tasa de acierto del 96,4%, una especificidad del 100% y una sensibilidad del 93,3%. Finalmente, también resultan sorprendentes los resultados obtenidos para la combinación de los 8 sensores incluidos en la tabla 6 dado que se obtuvo un 100% de tasa de acierto, sensibilidad y especificidad.