

MÉTODO Y DISPOSITIVO PARA DISCRIMINAR ENTRE INFECCIONES VIRALES Y BACTERIANAS

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

[0001] La presente invención se relaciona con el campo de los ensayos de puntos de atención de pacientes (PDA) para discriminar entre infecciones virales y bacterianas. Más particularmente, la invención pertenece a un inmunoensayo que distingue rápidamente entre infecciones virales y/o bacterianas.

Antecedentes

[0002] La fiebre es una causa común de las visitas de los niños a los centros de urgencias, tanto para la medicina familiar como para los consultorios pediátricos. Lo más común es que esto se relacione con una infección respiratoria o gastroenteritis. La alta incidencia de fiebre en los niños y la administración con precaución de antibióticos innecesarios es motivo para desarrollar un ensayo de detección rápido de los biomarcadores que indican una infección viral y/o bacteriana.

[0003] La neumonía grave adquirida comunitaria es causada por infecciones bacterianas en alrededor del 60% de los casos, requiriendo la admisión en una unidad de cuidados intensivos (UCI) para alrededor del 10% de los pacientes. El 40% restante está relacionado con virus respiratorios. La mayoría de las infecciones respiratorias están relacionadas con la faringitis, de las cuales el 40% son causadas por virus y el 25-50% por estreptococos beta hemolíticos del grupo A. Estas últimas causas bronquiolitis aguda y neumonía.

[0004] Alrededor del 80% de todos los antimicrobianos se prescriben en la atención primaria, y hasta el 80% de estos son para indicaciones del tracto respiratorio. Las infecciones del tracto respiratorio son frecuentemente la causa más común de la tos en la atención primaria. A menudo se prescriben antibióticos de amplio espectro para la tos, incluyendo 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 resistencia a los antibióticos. Entre los factores que instan a los médicos a administrar antibióticos se encuentran la ausencia de un marcador de diagnóstico adecuado de infecciones bacterianas, la preocupación por la falta de seguimiento de los pacientes y la presión del tiempo.

[0005] Todavía es un desafío diferenciar rápidamente las infecciones virales de las bacterianas. Más recientemente, se han identificado muchos nuevos marcadores de diagnóstico. Varios de estos marcadores son muy prometedores para diferenciar las infecciones virales de las bacterianas. Tales proteínas incluyen las GTPasas Mx y la proteína C-Reactiva (CRP, por sus siglas en inglés).

[0006] Las proteínas Mx homólogas son miembros de la superfamilia de las GTPasas de alto peso molecular. Por consiguiente, estas GTPasas están reguladas positivamente por interferones alfa/beta de tipo I o tipo II (IFN). Las GTPasas Mx se expresan exclusivamente en células tratadas con IFN alfa/beta, pero no con IFN gamma. Los interferones de tipo I juegan un papel importante en las respuestas inmunológicas innatas y tienen funciones inmunomoduladoras, antiproliferativas y antivirales.

[0007] Estudios propios han demostrado que las proteínas Mx homólogas humanas tienen las siguientes ventajas: 1) Las proteínas Mx homólogas humanas en humanos se expresan en su mayoría en forma intracelular. Pueden ser visibles por tinción intracelular en la mayoría de los compartimentos celulares [16]. 2) Las proteínas Mx homólogas son inducidas de manera dependiente de la dosis [6]. 3) Las proteínas Mx homólogas humanas son específicamente inducidas por interferones de tipo I, no por IFN-gamma, IL-1, TNF-alfa, o cualquiera de las otras citoquinas por infección bacteriana [8,12]. 4) Las proteínas Mx homólogas humanas son mucho más detectables en comparación con los interferones de tipo I en el sistema sanguíneo periférico [6]. Por lo tanto, estas proteínas son un marcador para identificar enfermedades virales [7,14,15]. Además, estas proteínas podrían utilizarse como marcadores para identificar a los pacientes tratados con interferones de tipo I si los tratamientos con IFN tienen éxito o no [5, 9,10,11]. En estudios

tempranos detectamos estas proteínas por Western Blotting después de la SDS-PAGE.¹² Sin embargo, este procedimiento necesita más de dos días. Por lo tanto, establecimos un ELISA para detectar estas proteínas en dos días [13].

[0008] Basados en estos hechos y en la suposición de que los interferones de tipo I permanecen dentro de los niveles normales en pacientes con infecciones bacterianas, la expresión de la proteína Mx homóloga en sangre periférica es un marcador sensible y específico para la infección viral. De manera similar, se ha informado que la mayoría de las infecciones virales causan pequeñas concentraciones de respuesta en la fase aguda, y bajas concentraciones de proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés), niveles de procalcitonina (PCT) y proteína bactericida/incrementadora de la permeabilidad (BIP). Por lo tanto, estas proteínas se utilizarán para distinguir las enfermedades de origen viral respecto de aquellas de etiología bacteriana. Dado que la concentración plasmática de la CRP aumenta rápidamente tras la estimulación y disminuye rápidamente con una vida media corta, la CPR puede ser una herramienta muy útil para diagnosticar y monitorear infecciones y enfermedades inflamatorias. En Escandinavia, las pruebas de CPR en los puntos de atención de pacientes forman parte de la evaluación rutinaria de los pacientes con infecciones respiratorias en la práctica general, y su uso ha demostrado ser económico. En la práctica general, la CPR se considera valiosa en el diagnóstico de enfermedades bacterianas y en la diferenciación parcial entre infecciones bacterianas y virales. A menudo, el valor diagnóstico de la CRP es superior al de la tasa de eritrosedimentación (ES) y superior o igual al recuento de glóbulos blancos (RGB). La desventaja de este ensayo en puntos de atención de pacientes es el largo tiempo de detección. Estos ensayos necesitan entre un mínimo de 30 minutos y 2 horas.

[0009] Clínicamente, puede ser difícil diferenciar ciertas infecciones sistémicas virales y bacterianas. Los cultivos bacterianos suelen realizarse en casos de infecciones graves como la neumonía, o cuando la consecuencia de no tener un diagnóstico puede llevar a complicaciones graves, como en el caso de la faringitis estreptocócica. A menudo, los cultivos son difíciles de obtener. Lamentablemente, los cultivos virales no se realizan de forma rutinaria debido a

la considerable demora en la recepción de los resultados. Los nuevos paneles de PCR de relevamiento viral son útiles, pero son costosos y no proporcionan información en los puntos de atención de pacientes, puesto que los resultados solo pueden obtenerse luego de 24 horas. Por lo tanto, sigue siendo necesaria un ensayo de diagnóstico simple y fácil de usar que sea capaz de diferenciar las infecciones virales y bacterianas en poco tiempo.

[0010] WO 2010/033963 revela un inmunoensayo de flujo lateral para la detección y diferenciación entre infecciones virales y bacterianas. El marcador bacteriano es CRP y el marcador viral es la proteína Mx-A. El ensayo se comercializa en Europa bajo el nombre comercial FebriDx®. Sin embargo, según un estudio, el FebriDx® solo tiene una precisión del 63% y 84% para identificar infecciones bacterianas y virales respectivamente¹⁷. Por lo tanto, sigue siendo necesario un ensayo diagnóstico rápido en los puntos de atención de pacientes para una discriminación más precisa y confiable entre las infecciones bacterianas y virales en los pacientes.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] El objeto de la presente invención es proporcionar un ensayo diagnóstico mejorado y más preciso y específico para la discriminación confiable de las infecciones bacterianas y virales en pacientes en poco tiempo. El objetivo se alcanza con el objeto de la presente invención.

[0012] De acuerdo con la invención, se proporciona un dispositivo de inmunoensayo para puntos de atención de pacientes (PDA) que comprende:

- a. una zona de aplicación de muestra, y
- b. una zona de detección con un primer reactivo de detección con afinidad de unión a la proteína Mx-B (Mx-B), y un segundo reactivo de detección con afinidad de unión a la proteína C-reactiva (CRP/PCT), y

en donde el dispositivo está configurado para detectar Mx-B y CRP/PCT en una muestra de un sujeto para discriminar entre infección bacteriana y viral.

[0013] De acuerdo con una forma de realización adicional de la invención, se proporciona un dispositivo de inmunoensayo para puntos de atención de pacientes (PDA) que comprende:

- a. una zona de aplicación de la muestra, y
- b. una zona de detección con un primer reactivo de detección con afinidad de unión a la proteína Mx-B (Mx-B), y un segundo reactivo de detección con afinidad de unión a la proteína C reactiva (CRP), y un tercer reactivo de detección con afinidad de unión a la procalcitonina (PCT) y/o un cuarto reactivo de detección con afinidad de unión a la proteína bactericida/incrementadora de la permeabilidad BIP, y

en donde el dispositivo está configurado para detectar Mx-B y CRP/PCT en una muestra de un sujeto para discriminar entre infección bacteriana y viral.

[0014] Una forma de realización de la invención se relaciona con el dispositivo como se describe en la presente, que además comprende un tercer reactivo de detección con afinidad de unión al BIP.

[0015] Una forma de realización de la invención se relaciona con el dispositivo descrito en la presente, en donde dichos reactivos de detección son seleccionados de moléculas sintéticas, nucleótidos, ácidos nucleicos, aptámeros, péptidos, proteínas, enzimas y anticuerpos.

[0016] Una forma de realización de la invención se relaciona con el dispositivo como se describe en la presente, en donde los reactivos de detección están marcados con un marcador detectable.

[0017] Una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el dispositivo como se describe en la presente, en donde el marcador detectable está seleccionado de una marca de enzima, marca fluorescente, radiomarca, marca particulada, partícula de látex coloreado, partícula de plástico coloreado, una partícula de fósforo coloreado, y una partícula fluorescente.

[0018] Una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el dispositivo tal como se describe en la presente, que comprende además una ventana de ensayo configurada para permitir la observación de los resultados del ensayo.

[0019] Una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el dispositivo como se describe en la presente, en donde los reactivos de detección están conjugados químicamente al marcador detectable para formar un complejo permanente e irreversible de reactivo-marcador.

[0020] Una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el dispositivo como se describe en la presente, en donde el marcador detectable conjugado con el reactivo de detección está configurado para ser visible para un usuario cuando la muestra es positiva para Mx-B y/o CRP y/o PCT y/o BIP.

[0021] Una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el dispositivo como se describe en la presente, en donde el dispositivo está configurado para PCT y/o BIP en muestras de sangre humana.

[0022] Una forma de realización de la invención se relaciona con un método para discriminar entre infección bacteriana y viral en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una muestra de dicho sujeto,
- b. proporcionar el sistema de ensayo como se describe en la presente,
- c. aplicar la muestra al sistema de ensayo,
- d. observar la ausencia o la presencia del complejo reactivo-marcador detectable para determinar si la muestra contiene Mx-B y/o CRP y/o PCT y/o BIP, y
- e. determinar el estado de infección del paciente.

[0023] Una forma de realización de la invención se relaciona con el método descrito en la presente, en donde

- a. la presencia de Mx-B y la ausencia y/o baja detección de CRP/PCT/BIP es indicativa de una infección viral,
- b. la ausencia de Mx-B y la presencia de CRP/PCT/BIP es indicativa de una infección bacteriana; y
- c. la presencia de Mx-B y la presencia de CRP/PCT/BIP es indicativa de una infección mixta.

[0024] Una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el método como se describe en la presente, observando además la ausencia o

presencia del complejo reactivo-marcador detectable para determinar si la muestra contiene CRP/PCT/BIP.

[0025] Una forma de realización de la invención se relaciona con el método como se describe en la presente, en donde

- a. la presencia de Mx-B y la ausencia de CRP/PCT y BIP es indicativa de una infección viral,
- b. la ausencia de Mx-B y la presencia de CRP/PCT y BIP es indicativa de una infección bacteriana; y
- c. la presencia de Mx-B y la presencia de CRP/PCT y BIP es indicativa de una infección mixta.

[0026] Una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el método como se describe en la presente, en donde la muestra es una muestra de sangre.

[0027] Una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el método como se describe en la presente, en el que la presencia de Mx-B, CRP/PCT y/o BIP es visible a simple vista.

Breve descripción de las figuras

[0028] La Figura 1A muestra una configuración de ensayo a modo de ejemplo que consiste en tres tiras de ensayo cubiertas con anticuerpos marcados.

[0029] La Figura 1B muestra los diferentes imágenes de ensayos para infecciones virales, infecciones bacterianas, infecciones mixtas o infecciones dudosas.

[0030] La Figura 2 muestra los resultados para diferentes patógenos virales y bacterianos.

Descripción de las formas de realización

[0031] La presente invención proporciona un ensayo para puntos de atención de pacientes que es capaz de diferenciar las infecciones virales y bacterianas en poco tiempo. Específicamente, se proporciona un dispositivo de diagnóstico para puntos de atención de pacientes que comprende marcadores de ensayo

tanto para infecciones virales como bacterianas, que asiste eficazmente al médico en la rápida diferenciación de las infecciones virales y bacterianas. El ensayo para puntos de atención de pacientes tiene las siguientes ventajas:

- 1) Este ensayo puede reducir drásticamente los costos de la atención médica al limitar los diagnósticos erróneos y, por consiguiente, el uso excesivo y erróneo de los antibióticos.
- 2) La eficacia y la garantía de este ensayo es que se reducirá la resistencia contra los antibióticos, dado que estos se usarán solo cuando haya una infección bacteriana.
- 3) Este ensayo aumentará el portfolio de diagnósticos de la oficina del médico y los farmacéuticos.

[0032] Por lo tanto, la presente invención contribuye al uso apropiado de los antibióticos. Esto significa el uso de los antibióticos sólo cuando se necesitan y, de ser necesario, usarlos correctamente.

[0033] Los antibióticos no combaten las infecciones causadas por virus como resfriados, gripe, la mayoría de los dolores de garganta y bronquitis. Incluso muchas infecciones de los senos nasales y los oídos pueden mejorar sin antibióticos. En cambio, el alivio de los síntomas podría ser la mejor opción de tratamiento para estas infecciones. Tomar antibióticos para las infecciones virales, como los resfriados, la gripe, la mayoría de los dolores de garganta y la bronquitis:

- no curará la infección;
- no evitará que otras personas se enfermen;
- no le ayudará a usted o a su hijo a sentirse mejor;
- puede causar efectos secundarios innecesarios y dañinos; y
- puede contribuir a la resistencia a los antibióticos, que es cuando las bacterias son capaces de resistir los efectos de un antibiótico y siguen causando daño.

[0034] Los antibióticos prescritos de manera incorrecta tienen un beneficio terapéutico cuestionable y exponen a los pacientes a potenciales complicaciones de la terapia antibiótica. El rápido resultado obtenido en el

ensayo para puntos de atención de pacientes permite un diagnóstico correcto y da soporte al médico en su decisión de prescribir la medicación correcta.

[0035] Para el ensayo en los puntos de atención a pacientes pueden aplicarse diferentes dispositivos, por ejemplo, el dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral o un sistema de sensores ópticos, que está diseñado para interactuar con un dispositivo de computadora móvil como se describe en WO 2016/116181.

[0036] Así, según una forma de realización de la presente invención, se utiliza un dispositivo de análisis de muestras, por ejemplo, una tira reactiva, para determinar si una infección es bacteriana o viral. La tira de ensayo incluye una zona de aplicación de la muestra y una zona de detección. En este método, se recoge una muestra y se transfiere a la tira de ensayo. La zona de detección incluye al menos un reactivo específico para un marcador bacteriano y al menos un reactivo específico para un marcador viral.

[0037] En una forma de realización, el marcador de infección viral es Mx-B y el marcador de infección bacteriana es la proteína C reactiva (CRP). Altos niveles de proteína Mx-B están fuertemente correlacionados con infección viral sistémica. Las proteínas del mixovirus inducible por interferón (Mx) desempeñan un papel importante en la lucha contra una amplia gama de infecciones virales. Las proteínas Mx homólogas inhiben los virus de ARN y ADN.

[0038] Recientemente se ha descubierto que la proteína Mx-B es la proteína importante que transporta los componentes virales fuera de la célula [2]. Por ejemplo, la proteína de VIH será transportada y eliminada por la proteína Mx-B, y no por la proteína Mx-A [1]. Por lo tanto, este ensayo para puntos de atención de pacientes utiliza la proteína Mx-B, porque tiene solo un 63% de homología con la proteína Mx-A, y por lo tanto es la proteína Mx funcional dentro de la familia de las GTPasas Mx [3]. Se demostró que la Mx-B inhibe fuertemente las infecciones virales al reducir el nivel de ADN viral integrado. Además, la proteína Mx-B se encuentra dentro del núcleo y el citoplasma. En contraste, la proteína Mx-A solo se encuentra en el citoplasma [4]. En base a los nuevos

hallazgos, Mx-B es seleccionada por los inventores como un marcador confiable para las infecciones virales.

[0039] La proteína C-reactiva (CRP), una proteína de fase aguda producida por el hígado en respuesta a una infección, es un biomarcador confiable para las infecciones bacterianas. Los niveles de CRP en individuos sanos se consideran inferiores a 0,5 mg/L, y los niveles de CRP están elevados en condiciones infecciosas.

[0040] La procalcitonina (PCT) es una hormona polipeptídica con 116 aminoácidos. Esta proteína es producida principalmente por las células C de la glándula tiroides. Normalmente hay un nivel muy limitado de PCT en la sangre. Por el contrario, durante una infección bacteriana esta proteína se expresará y se encontrará entre 0,5 ng/ml y 2 ng/ml. La ventaja de esta proteína es que se detectará después de 6 horas de la infección, mientras que la CRP se detectará, lo más temprano, en el punto temporal de 12-16 horas.

[0041] De acuerdo con una forma de realización de la invención, la presente invención se relaciona con un ensayo de detección rápido para identificar Mx-B y/o CRP/PCT/BIP en una muestra de un paciente. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre periférica, aspirados nasofaríngeos, lágrimas, líquido espinal y aspirados del oído medio.

[0042] La proteína bactericida/incrementadora de la permeabilidad (BIP) es una proteína pluripotente localizada en los neutrófilos y el tejido que probablemente juega un papel fundamental en la defensa del hospedador contra las bacterias Gram-negativas y su endotoxina por medio de sus funciones de neutralización y eliminación de antibióticos y endotoxinas. La BIP se considera un marcador biológico adicional para el ensayo para puntos de atención a pacientes mejorado, con el fin de mejorar la fiabilidad y la precisión del ensayo. Durante una infección bacteriana esta proteína se expresará y se encontrará entre 1 µg/ml y 20 µg/ml.

[0043] Por lo tanto, una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el ensayo para puntos de atención de pacientes para identificar Mx-B, BIP, y/o CRP/PCT en una muestra de un paciente.

[0044] De acuerdo con una forma de realización de la invención, la zona de detección incluye al menos un reactivo con afinidad de unión al marcador viral Mx-B y al menos un reactivo con afinidad de unión al marcador bacteriano CRP/PCT y opcionalmente al menos un reactivo con afinidad de unión a la BIP de manera que, cuando los marcadores presentes en la muestra entren en contacto con los respectivos reactivos, se produzca una forma compleja marcada. La zona de detección incluye un socio de unión al marcador bacteriano que se une al primer complejo marcado y un socio de unión al marcador viral que se une al segundo complejo marcado. La muestra entonces se analiza para detectar la presencia del marcador viral y/o del marcador bacteriano.

[0045] La zona de detección puede ser funcionalizada mediante la inmovilización de varias moléculas receptoras que se unen específicamente a los marcadores respectivos. Las moléculas receptoras pueden ser seleccionadas de origen natural, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o similares. Las moléculas receptoras pueden ser moléculas producidas sintéticamente, por ejemplo, aptámeros. La zona de detección comprende al menos una región sensora, en la que, como receptores para el sensado de los marcadores respectivos, se disponen anticuerpos u otros receptores que imparten especificidad, como los aptámeros, que se unen específicamente a los marcadores respectivos a ser detectados. De este modo se logra una funcionalización eficaz y fácil de aplicar de la superficie de la región sensora.

[0046] Los anticuerpos u otros receptores que imparten especificidad, como los aptámeros, tienen una alta selectividad para detectar analitos específicos; por lo tanto, son particularmente adecuados para reconocer marcadores de enfermedad específicos. En relación con los posibles receptores, los anticuerpos dispuestos en la superficie sensora u otros receptores que imparten especificidad, como los aptámeros, por ejemplo, se unen al analito que a ser detectado y, en el proceso, producen un cambio en las propiedades. En algunas formas de realización, los aptámeros tienen la ventaja de ser más estables y, por lo tanto, permanentemente funcionales.

[0047] Puesto que los aptámeros comparten aplicaciones similares a los anticuerpos, numerosos métodos de detección que aprovechan los anticuerpos pueden ser desarrollados como métodos basados en aptámeros. Por ejemplo, la mayoría de los inmunoensayos para moléculas pequeñas son ensayos competitivos que se basan en el reemplazo de anticuerpos unidos a superficie por analito en solución.

[0048] Una forma de realización de un dispositivo de la presente invención incluye una zona de aplicación de la muestra.

[0049] Una forma de realización adicional de la invención se relaciona con el dispositivo que además incluye una zona de reactivos. La zona de reactivos comprende al menos un reactivo específico para el marcador bacteriano viral, de modo que cuando un marcador viral presente en la muestra entra en contacto con dicho reactivo, se forma un complejo de reactivos virales marcado. Además, la zona de reactivos comprende al menos un reactivo específico para el marcador bacteriano, de manera que cuando un marcador bacteriano presente en la muestra entra en contacto con dicho reactivo, se forma un complejo de reactivos bacterianos marcado. En una forma de realización de la invención, la zona del reactivo comprende un reactivo específico para el marcador bacteriano CRP/PCT y un reactivo específico para el marcador bacteriano BIP, de modo que, cuando dichos marcadores bacterianos presentes en la muestra entran en contacto con dichos reactivos, se forman complejos marcados.

[0050] La zona de detección del dispositivo incluye un socio de unión al marcador viral que se une al complejo de reactivos virales marcado y un socio de unión al marcador bacteriano que se une al complejo de reactivos bacterianos marcado. El dispositivo podría ser una tira de ensayo cromatográfico.

[0051] En una forma de realización preferida, la presencia del marcador viral o del marcador bacteriano se indica mediante una línea de ensayo visible a simple vista. La presencia del marcador viral puede indicarse mediante una primera línea de ensayo, mientras que la presencia del marcador bacteriano se indica mediante una segunda y/o tercera línea de ensayo. En algunas formas

de realización, la primera línea de ensayo muestra un primer color cuando es positiva y la segunda línea de ensayo muestra un segundo color diferente del primer color cuando es positiva, y/o la tercera línea de ensayo muestra un tercer color diferente del primero y del segundo colores cuando es positiva. En las formas de realización en las que la primera, segunda y tercera línea de ensayo están situadas en el mismo espacio del dispositivo de análisis de muestras, es ventajoso que se formen diferentes colores cuando la primera, segunda y/o tercera líneas de ensayo son positivas.

[0052] En una forma de realización, las dos o tres líneas de ensayo están separadas espacialmente entre sí en el dispositivo. En tal forma de realización, el color puede ser el mismo cuando las líneas de ensayo son positivas.

[0053] En una forma de realización de la invención, la muestra a analizar es aplicada a un portador. El portador puede estar hecho de un solo material cromatográfico, o preferiblemente de varios materiales activos capilares hechos de los mismos o diferentes materiales y fijados en un soporte portador. Estos materiales están en estrecho contacto entre sí para formar una trayectoria de transporte a lo largo de la cual un líquido impulsado por fuerzas capilares fluye desde una zona de aplicación, pasando por la zona de reactivos, hacia una o más zonas de detección.

[0054] Preferentemente, la muestra se aplica directamente al portador sumergiendo la zona de aplicación del portador en la muestra. Alternativamente, la aplicación de la muestra al portador puede realizarse recogiendo la muestra con un elemento de barrido seco o húmedo, desde el cual la muestra puede ser transferida, opcionalmente después de ser humedecida, a la zona de aplicación del portador. Por lo general, el elemento de barrido es estéril y puede estar seco o pretratado con un líquido antes de la etapa de recolección. Los materiales adecuados para los elementos de barrido de acuerdo con la invención pueden ser materiales sintéticos, tejidos o telas fibrosas.

[0055] Dependiendo del tipo de método de detección, existen diferentes reactivos presentes en la zona de reactivos, que se encuentra entre la zona de aplicación y la zona de detección. En un inmunoensayo sándwich, se prefiere

tener un reactivo marcado no inmovilizado en la zona de reactivos que sea específico para el marcador viral y el bacteriano a ser detectados. Así, cuando un marcador viral o bacteriano presente en la muestra entra en contacto con el correspondiente reactivo marcado viral o bacteriano presente en la zona del reactivos, se forma un complejo marcado entre el marcador y el correspondiente reactivo marcado. A su vez, el complejo marcado es capaz de formar un complejo adicional con un socio de unión al marcador viral o bacteriano inmovilizado en la zona de detección. En un inmunoensayo competitivo, la zona de reactivos contiene preferentemente un análogo de marcador no inmovilizado marcado que compite con el marcador por el socio de unión al marcador inmovilizado en la zona de detección. Los socios de unión al marcador en la zona de reactivos y en la zona de detección son preferentemente anticuerpos monoclonales, policlonales o recombinantes o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse específicamente al marcador correspondiente.

[0056] La detección del marcador puede lograrse en la zona de detección. La molécula inmovilizada se une al complejo marcado o al marcador-analógico marcado por reacción inmunológica u otra reacción en la zona de detección, construyendo así una línea de ensayo visible en la zona de detección durante el proceso. Preferentemente, la marca es una marca detectable ópticamente. La formación de un complejo en la zona de detección inmoviliza la marca y la línea de ensayo se hace visible a simple vista, lo que indica un resultado de ensayo positivo. Son adecuadas, por ejemplo, las marcas directas, por ejemplo particularmente las marcas de oro, que se reconocen mejor a simple vista. Además, se puede utilizar un dispositivo de lectura electrónico (por ejemplo, sobre la base de un transductor fotométrico, acústico, impedimétrico, potenciométrico y/o amperométrico) para obtener resultados más precisos y una semicuantificación del analito. Otras marcas adecuadas pueden ser de látex, fluoróforos o fosforóforos.

[0057] En una forma de realización, la sensibilidad de los ensayos de inmunoensayo de flujo lateral de lectura visual se potencia agregando una pequeña cantidad de colorante fluorescente o conjugados de perlas de látex

fluorescente al material conjugado inicial. Cuando la línea de ensayo del espectro visible está visiblemente presente, se observa y se registra el resultado del ensayo.

[0058] En una forma de realización de la invención, los reactivos están configurados de tal manera que la línea de ensayo visible correspondiente a la presencia del marcador viral estará separada de las líneas de ensayo correspondientes a la presencia de los marcadores bacterianos. Por lo tanto, puede determinarse fácilmente si la muestra contenía marcadores bacterianos o virales (o ambos) simplemente por la ubicación del desarrollo de las líneas de ensayo en la zona de detección. En una forma de realización adicional preferida, los reactivos pueden elegirse de manera que se desarrollen líneas de ensayo de diferente color. Es decir, la presencia de un marcador viral causará el desarrollo de una línea de color diferente a la desarrollada por la presencia de un marcador bacteriano. Por ejemplo, la marca correspondiente al reactivo que reconoce el marcador viral puede ser roja, mientras que la marca correspondiente al reactivo que reconoce los marcadores bacterianos puede ser verde. Las marcas de colores diferentes que pueden adherirse a los reactivos no inmovilizados son bien conocidas. Algunos ejemplos son, entre otros, el oro coloidal, el selenio coloidal, el carbono coloidal, las perlas de látex, las perlas paramagnéticas, las perlas fluorescentes y quimioluminiscentes y mezclas de las mismas.

[0059] En la Figura 1 se muestra una tira de ensayo cromatográfico con una línea de ensayo que corresponde a la presencia de un marcador viral, una segunda línea de ensayo separada que detecta la presencia de un primer marcador bacteriano y una tercera línea de ensayo separada que detecta la presencia de un segundo marcador bacteriano. La muestra es aplicada a la zona de aplicación de la tira de ensayo. Como se muestra en la Figura 1, la muestra pasa luego por una zona de reactivos que contiene al menos un socio de unión viral marcado y al menos un socio de unión bacteriano marcado. El socio de unión viral marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador viral de interés para formar un conjugado que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo o socio de unión específico en la zona

de detección. El socio de unión bacteriano marcado es capaz de unirse específicamente a un marcador bacteriano de interés para formar un conjugado que a su vez es capaz de unirse específicamente a otro reactivo o socio de unión específico en la zona de detección.

[0060] La tira de ensayo también incluye una zona de detección que contiene al menos una primera sección para la detección de un marcador viral, por ejemplo, una línea de ensayo, que incluye un socio de unión específico inmovilizado, complementario al complejo de reactivo viral formado por el marcador viral y su socio de unión marcado. Así pues, en la línea de ensayo, los socios de unión de la zona de detección atrapan a los socios de unión del virus marcados de la zona del reactivo junto con sus marcadores virales unidos. Esta localización del marcador viral con sus socios de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de ensayo. En la línea de ensayo, la presencia del marcador viral se determina por la lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de ensayo que resulta de la acumulación de socios de unión marcados.

[0061] La zona de detección también incluye al menos una sección para la detección de al menos un marcador bacteriano, por ejemplo, una línea de ensayo, que incluye un socio de unión específico inmovilizado, complementario del complejo reactivo bacteriano formado por el marcador bacteriano y su socio de unión marcado. Así pues, en la línea de ensayo, los socios de unión de la zona de detección atrapan a los socios de unión bacteriana marcados de la zona de reactivos junto con sus marcadores bacterianos unidos. Esta localización del marcador bacteriano con sus socios de unión marcados da lugar a una indicación en la línea de ensayo. En la línea de ensayo, la presencia del marcador bacteriano se determina por la lectura cualitativa y/o cuantitativa de la indicación de la línea de ensayo que resulta de la acumulación de los aglutinantes marcados.

[0062] En una forma de realización de la invención, la zona de detección puede contener una línea de ensayo adicional para detectar un segundo marcador bacteriano.

[0063] En la Figura 1 se muestra un ejemplo de un ensayo de puntos de atención de pacientes para distinguir la infección viral y la bacteriana. Como se mencionó anteriormente, Mx-B es un marcador de diagnóstico para la infección viral, mientras que CRP y el BIP son marcadores de diagnóstico para la infección bacteriana. Un resultado positivo para la proteína Mx-B, con un resultado negativo para la proteína CRP/PCT y BIP indica una infección viral. Un resultado positivo para el CRP/PCT y BIP con un resultado negativo para la proteína Mx-B indica una infección bacteriana. Un resultado débilmente positivo para la proteína Mx-B, CRP/PCT y BIP indica una infección tanto de una bacteria como de un virus (coinfección). Un resultado negativo para Mx-B, CRP/PCT e BIP indica ninguna infección bacteriana o viral. Mientras que se discuten en este ejemplo líneas de color particulares, están dentro del espíritu de la presente invención otros colores, o los mismos colores en diferentes lugares de la tira de ensayo para indicar marcadores virales o bacterianos.

[0064] Cuando se utiliza el desarrollo de líneas de diferentes colores, las líneas pueden o no estar separadas por espacios. En este último caso, las marcas se eligen de tal manera que el color que se ve cuando ambos marcadores están presentes es diferente de los colores que se ven cuando los marcadores individuales están presentes. Por ejemplo, la presencia del marcador viral puede indicarse con una línea roja; la presencia del marcador bacteriano con una línea azul; y la presencia de ambos con una línea púrpura (rojo y azul combinados).

[0065] En una forma de realización adicional, la tira reactiva puede incluir también una sección de control que indique la funcionalidad de la tira reactiva. Si está presente, la sección de control puede estar diseñada para transmitir una señal al usuario de que el dispositivo ha funcionado. 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. Como otra alternativa, la sección de control podría contener marcadores virales y bacterianos inmovilizados que reaccionarán con el exceso de reactivo marcado de la zona de reactivos. La sección de control puede estar situada aguas arriba o aguas abajo de la zona de detección. Un indicador de control positivo indica al usuario

que la muestra ha permeado la distancia requerida a través del dispositivo de prueba.

[0066] Los homólogos de Mx también podrían ser detectados en aproximadamente el 10% de las infecciones bacterianas asociadas con fiebre. Para mejorar la confiabilidad del ensayo, el valor de corte de la proteína Mx-B se establece en el rango de 0,01-0,05 U/10.000 leucocitos, preferiblemente de 0,025 U/10.000 leucocitos. Para la CRP, el valor de corte se establece en el rango de 5-100 mg/L, o en el rango de 25-75 mg/L, o de 40 mg/L. Para la PCT el valor de corte se establece en el rango de 0,5 ng/ml a >2 ng/ml. Para la BIP el valor de corte se establece en el rango de 1 µg/ml a >10 µg/ml.

EJEMPLOS

[0067] Los ejemplos a continuación se exponen para ayudar a comprender la invención, pero no se pretende que sean interpretados ni deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención en ninguna forma. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de los métodos convencionales. Dichos métodos son bien conocidos por aquellos con conocimientos comunes en la técnica.

Ejemplo 1 – Descripción del ensayo

[0068] El ensayo de Puntos de Atención de pacientes se realiza con un dispositivo de flujo lateral. Los reactivos apropiados necesarios para cada ensayo ya están incluidos en el cartucho.

Etapa A: Debido a la fuerza adhesiva, una gota de sangre (aprox. 0,005 ml-0,010 ml) es transferida por el cartucho al dispositivo.

Etapa B: En primer lugar, las células en la gota de sangre son lisadas con aprox. 0,001 ml de tampón de lisis que consiste en (NP-40 20%, Tris-HCl 100 mM, pH 7,2, azida sódica 0,05).

Etapa C: La sangre lisada es dirigida por encima de dos tiras de ensayo y, por lo tanto incubada.

Etapa D: La solución de anticuerpos 1 contra Mx-B se une a la posible proteína Mx-B disponible en la sangre. Este anticuerpo ya está conjugado con un marcador marcado.

Etapa D: La proteína Mx-B unida se dirigirá sobre una segunda solución portadora, en la que se encuentra un segundo anticuerpo contra Mx-B. Solo la proteína Mx-B ya unida con el primer anticuerpo marcado se unirá al segundo anticuerpo.

Etapa E: Después de enjuagar la solución portadora, el primer anticuerpo marcado y unido se hace visible en forma de una reacción de color en la tira.

Etapa F: La detección de CRP/PCT/BIP se realiza como se describe en las etapas A a E, mientras que en la segunda tira de ensayo se utiliza un anticuerpo contra CRP/PCT y un anticuerpo contra BIP.

Ejemplo 2 – Procedimiento de ensayo

[0069] En dos ambulancias diferentes, los pacientes de origen desconocido fueron examinados para detectar la proteína Mx-A, la proteína Mx-B, CRP/PCT y BIP de la sangre entera. Todos los pacientes firmaron una declaración de consentimiento bajo el Acuerdo de Helsinki de que sus datos están destinados únicamente a la investigación. 113/5000. Posteriormente, se continuó la anamnesis en el curso de las investigaciones y se determinó el origen de la infección. Así, se pudieron distinguir 120 infecciones virales y 50 infecciones bacterianas. El resultado de esta investigación está documentado en la FIG. 2. Con la ayuda de la proteína Mx-B, se detectó el 92% de las infecciones virales. En contraste, solo el 77% de enfermedades virales idénticas fueron detectadas con la proteína Mx-A. Con la ayuda de las proteínas de determinación CRP/PCT/BIP, el espectro para la detección de enfermedades bacterianas se incrementó hasta el 90%. Si solo se hubieran medido las proteínas CRP y PCT, solo se habría detectado el 80% de las enfermedades bacterianas. Por lo tanto, la combinación de los marcadores de la proteína Mx-B para enfermedades virales y CRP/PCT/BIP para enfermedades bacterianas da como resultado una detección de sensibilidad o especificidad de más del 90%.

Ejemplo 3 – Resultados

[0070] Descripción de los resultados de una infección viral: Para probar que la reacción de color está funcionando, las dos tiras de ensayo del lado izquierdo son controles. La tira del medio en la parte superior es de color, la tira de abajo permanece incolora. Ambas tiras del lado derecho permanecen incoloras.

[0071] Descripción de los resultados de una infección bacteriana: Ambas tiras del medio permanecen incoloras, la de arriba también, pero la de abajo es incolora.

[0072] Descripción de los resultados de una infección mixta: La franja del medio en la parte superior es de color y la de abajo también.

Referencias:

[1] Haller, O., Dynamins are forever Mx-B inhibits HIV-1. *Cell Host Microbe*. 2013 Oct 16;14(4):371-3.

[2] Wei W., et al., Accumulation of Mx-B/Mx2-resistant HIV-1 Capsid Variants During Expansion of the HIV-1 Epidemic in human populations. *EBioMedicine*. 2016 Jun; 8: 230–236.

[3] Melen, K., et al., Human Mx-B protein, an interferon-alpha inducible GTPase, contains a nuclear targeting signal and is localized in the heterochromatin-region beneath the nuclear envelope. *J Biol Chem*. 1996 Sep 20;271(38):23478-86.

[4] Gao, S., et al., Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like Mx-A. *Nature*. 2010 May 27;465(7297):502-6.

[5] Wussow, P.v., et al., Humoral response to recombinant IFN- γ 2b in patients receiving recombinant IFN- γ therapy. *J Interferon Res*. 1989 Sep;9 Supl 1:S25-31

[6] Jakschies, D., et al., Emergence and decay of the human MX homolog in mononuclear cells from cancer patients during and after IFN- γ therapy. *J Biol Response Mod*. 1990 Jun;9(3):305-12.

[7] Wussow, P.v., et al., The interferon-induced MX-homologous protein in patients with symptomatic HIV-1-infection. *AIDS*. 1990 Feb;4(2):119-24.

[8] Wussow, P.v., et al., The human MX-homologous protein is specifically induced by type-I-IFNs. *Eur. J. Immunology*. 1990 Sep;20(9), 2015 2019.

- [9] Jakschies D., et al., Correlation of the antiproliferative effect and the Mx homologous protein induction by IFNs in patients with malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 1990 Dic;95(6 Supl):238S-241S.
- [10] Wussow, P.v., et al., Effective natural interferon-alpha therapy in recombinant interferon-alpha-resistant patients with hairy cell leukemia. *Blood.* 1991 Jul 1;78(1):38-43.
- [11] Wussow, P.v., et al., Treatment of anti RIFN- γ -2 antibody positive CML-patients with natural IFN- γ . *Br J Haematol.* 1991 Jun;78(2):210-6.
- [12] Jakschies, D., et al., The human IFN induced Mx-homologous proteins identified by 2D SDS-PAGE is specifically induced by type-I-interferons. (1991). *Proc. Int. Meeting on 2-D-Electrophoresis London, 16.18.7.1991:* 163.
- [13] Towbin, H., et al., A whole blood immunoassay for the interferon-inducible human Mx-protein. *J Interferon Res.* 1992 Abr;12(2):67-74.
- [14] Jakschies, D., et al., Strong transient expression of the interferon-induced Mx-A-protein in hepatitis A, but not in acute hepatitis B and C. *Hepatology.* 1994 Abr;19(4):857-65.
- [15] Rump, J.A., et al., Common variable immunodeficiency (CVID) and Mx-A-protein expression in blood leucocytes. *Clin Exp Immunol.* 1995 Jul;101(1):89-93.
- [16] Al-Masri, A., et al., Intracellular staining of Mx proteins in cells from peripheral blood, bone marrow and skin. *Mol Pathol.* 1997 Feb;50(1):9-14.
- [17] Self W.H., et al., Diagnostic Accuracy of FebriDx: A Rapid Test to Detect Immune Responses to Viral and Bacterial Upper Respiratory Infections. *J Clin Med.* 2017 Oct 7;6(10).