



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 N.º de publicación: **ES 2 088 361**

21 Número de solicitud: 9401426

51 Int. Cl.⁶: G01N 33/535

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.06.94**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.96**

Fecha de concesión: **07.01.97**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.97**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:
16.02.97

73 Titular/es: **Universidad de Salamanca
Patio de Escuelas Menores, N-1
37007 Salamanca, ES**

72 Inventor/es: **Simón Martín, Fernando;
Muro Alvarez, Antonio;
Cordero Sánchez, Miguel y
Perera Madrazo, Lorena**

74 Agente: **Hernández Covarrubias, Arturo**

54 Título: **Método de diagnóstico serológico in vitro de la dirofilariosis humana.**

57 Resumen:

Método de diagnóstico in vitro de la dirofilariosis pulmonar humana, mediante el uso del test serológico de enzimoimmuno-electrotransfer blot (EITB) y suero del individuo sospechoso de padecer dirofilariosis pulmonar humana. Comprende las etapas de (a) someter el extracto antigénico de vermes adultos de *D. immitis* electroforesis en gel de poliacrilamida de 12 por ciento; (b) electrotransferir las proteínas así separadas a nitrocelulosa; (c) hacer reaccionar las proteínas transferidas a nitrocelulosa con suero problema; y (d) revelar la reacción por incubación de la nitrocelulosa con un sustrato y posterior detención de la reacción con agua destilada.

ES 2 088 361 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

DESCRIPCION

Método de diagnóstico serológico in vitro de la dirofilariosis pulmonar humana.

Esta invención se relaciona con un método para el diagnóstico de la dirofilariosis pulmonar humana.

Dirofilaria immitis es un nematodo filarioideo que parasita el sistema cardiovascular de los cánidos, y con menor frecuencia el de otros animales. Los vermes adultos se localizan en el corazón, y las hembras una vez fecundadas ponen larvas (microfilarias) que viven en la sangre de los hospedadores. Estas larvas son tomadas, cuando pican, para alimentarse, por mosquitos culícidos, dentro de los cuales se transforman en el estado infestante (L3). Cuando un mosquito con L3 pica a otro hospedador le inocula estas larvas, que posteriormente se transforman en L4 y adultos.

Esta parasitosis, que se consideró inicialmente un problema de interés exclusivamente veterinario, ha tomado un carácter zoonótico ya que el hombre puede resultar infestado de la misma manera que los perros, por la picadura de un mosquito parasitado. Los perros parasitados constituyen verdaderos reservorios de parásitos para los humanos que residen habitual o accidentalmente en las áreas endémicas.

La infestación canina por *D. immitis* es cosmopolita. Actualmente existen datos epidemiológicos procedentes de Canadá, Estados Unidos, Bahamas, Antillas Holandesas, Brasil, China, Tailandia, Malasia, India, Japón, Nueva Zelanda, Australia, Kenia y sur de Europa (España, Francia Italia, Grecia e islas del Mediterráneo). Las prevalencias varían ampliamente entre 1 y 95% (1-8).

En el hombre *D. immitis* no se desarrolla, por lo general, hasta el estado adulto, aunque se han descrito casos de infestaciones por vermes adultos aislados y con localizaciones no habituales. Al no existir posibilidad de fecundación, no aparecen microfilarias circulantes en sangre. Los vermes pueden localizarse en una rama de la arteria pulmonar, produciendo una reacción hística que deriva en la formación de un nódulo pulmonar.

Los conocimientos existentes sobre la situación epidemiológica de la dirofilariosis humana se deben a revisiones de casos de dirofilariosis pulmonar publicados previamente, y a estudios seroepidemiológicos. Ciferri (9) revisó 60 casos de nódulos pulmonares solitarios causados o presumiblemente causados por *D. immitis* en años precedentes, y un estudio semejante fue realizado por Makiya (10) en Japón. Son muy escasos los estudios seroepidemiológicos sobre dirofilariosis humana, realizados hasta el momento. La mayoría se han llevado a cabo en Estados Unidos, Australia, Japón y España (11, 12, 13, 14), pero faltan por completo en el resto de las áreas con endemia canina anteriormente señaladas. Las prevalencias observadas varían entre 5 y 32%, y parecen correlacionadas con las prevalencias observadas en los perros de las correspondientes áreas. Estos datos confirman que el riesgo de infestación de las personas residentes en áreas endémicas es tan elevado como el de los perros. La detección de anticuerpos específicos anti-*D. immitis* en humanos ha de

interpretarse, en principio, como indicativo de la existencia de contacto con el parásito. Sin embargo, parte de los individuos que resultan infestados desarrollan manifestaciones, generalmente en forma de nódulos pulmonares (solitarios o no), y mucho más raramente con otras localizaciones, de las cuales la más común es la cutánea.

La mayoría de los casos humanos de dirofilariosis pulmonar han sido diagnosticados anatómicamente tras biopsia pulmonar por toracotomía, ante el hallazgo de un nódulo solitario pulmonar. El incremento en el número de casos descritos en la última década refleja, probablemente, la creciente extensión de la parasitosis canina y no una mayor alertar diagnóstica sobre la afección humana (15).

En cuanto a la clínica, la dirofilariosis pulmonar se presenta claramente diferenciada en dos grupos. El primero agrupa a los enfermos asintomáticos, en los que se detecta casualmente como un nódulo solitario pulmonar, al realizar radiología torácica por enfermedad base de muy distinta naturaleza. El segundo corresponde a los enfermos con síntomas. En éste predominan los enfermos con sintomatología inespecífica conformada por distintas combinaciones de tos, dolor pleurítico, no pleurítico, expectoración purulenta, esputos hemoptóicos, fiebre y otros síntomas. Desde el punto de vista radiológico la lesión característica es el nódulo solitario pulmonar. Sólo en algunos casos descritos, los nódulos eran múltiples. En la mayoría de los casos, las características del nódulo (bordes bien definidos y lisos, forma esférica u ovoide y densidad homogénea) son sugerentes de benignidad. La localización de la mayoría de los nódulos es subpleural, debido posiblemente al calibre del parásito, que se corresponde con el de las arteriolas pulmonares periféricas.

El diagnóstico de la dirofilariosis humana, actualmente, está limitado por dos hechos: 1. No existen microfilarias circulantes (amicrofilaremia), y por tanto no puede recurrirse al examen de muestras de sangre. 2. Tanto la clínica como los datos complementarios analíticos y radiológicos, son inespecíficos, por lo que no tienen utilidad para establecer el diagnóstico etiológico.

Existen dos tipos de diagnóstico bien diferenciados: los métodos directos (técnicas de visualización de las lesiones o de los propios parásitos) y métodos indirectos (serología).

Radiología, toracotomía y posterior biopsia, punción-aspiración con aguja fina o gruesa, son técnicas que se han empleado y se emplean profusamente en el diagnóstico de la dirofilariosis pulmonar humana (16, 17, 18). Los inconvenientes de estos métodos son su carácter invasivo, lo que implica un incremento del gasto por proceso diagnóstico (al precisarse infraestructura y personal especializados), así como, inevitablemente, un cierto grado de morbimortalidad. Además, la punción -aspiración con aguja fina no parece proporcionar suficiente material para realizar el diagnóstico etiológico en muchos casos.

Los métodos serológicos se han empleado hasta ahora en estudios epidemiológicos y para confirmar casos diagnosticados previamente por otros métodos, pero nunca como método prin-

cial de diagnóstico. Diferentes métodos inmunológicos han sido empleados con resultados diversos. A partir de 1985 se empezó a aplicar el enzimo-inmuno ensayo (ELISA) (19, 20, 21, 22), que por los resultados obtenidos parece ser el método más adecuado. Todos ellos se basan en el empleo de antígenos complejos procedentes de los adultos de *D. immitis*. Sólo en un caso se ha empleado un antígeno de 35 kDa, que se expresa en adultos, huevos y microfilarias, producido como proteína de fusión (23). Estas cuestiones determinan dos limitaciones importantes: 1. Como consecuencia de las reacciones cruzadas que se producen con otras enfermedades parasitarias y no parasitarias el porcentaje de falsos positivos es inaceptable y 2. Los test empleados nos permiten discriminar entre individuos con dirofilariosis sin alteraciones pulmonares e individuos con dirofilariosis pulmonar.

Hasta el momento, el diagnóstico de certeza de la dirofilariosis pulmonar humana (DPH), exige la aplicación de técnicas invasivas para obtener material histológico. Inevitablemente, estos métodos invasivos cursan con un grado de morbimortalidad. El uso de un método de diagnóstico indirecto basado en la serología evitaría esta iatrogenia. La utilización de extractos antigénicos completos, únicamente indica contacto con el parásito, por lo que en áreas de endemia canina, al ser elevada la probabilidad pre-test, una seropositividad tiene poco valor diagnóstico en caso de existir lesiones pulmonares.

El poder disponer de un método serológico que diferencie los meros contactos con el parásito de los casos con DPH, evitaría tanto la morbimortalidad asociada al diagnóstico invasivo, como la inespecificidad del diagnóstico realizado por serología con extractos antigénicos completos del parásito.

Se ha encontrado ahora, que un polipéptido de un Pm aproximado de 22 kDa reacciona con sueros de dirofilariosis pulmonar y, sin embargo, no reacciona con sueros de infestación por *D. immitis* sin nódulo pulmonar, ni con los sueros de pacientes con otras enfermedades parasitarias y no parasitarias.

Por tanto, de acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un método de diagnóstico basado en una reacción de reconocimiento específico en enzimo-inmuno electrotransfer blot (EITB), de un polipéptido de 22 kDa denominado (Di22) que forma parte de un complejo antigénico de adultos de *D. immitis*. Esta proteína, como ya se ha indicado, es reconocida sólo por los sueros de los individuos con dirofilariosis que han desarrollado granulomas pulmonares, discriminándolos de los seropositivos frente al antígeno completo (que indica contacto únicamente), y de otras enfermedades pulmonares no parasitarias.

El método de detección según la invención se realiza "in vitro" mediante el empleo del test serológico de enzimo-inmuno electrotransfer blot (EITB), y suero del individuo sospechoso de padecer dirofilariosis pulmonar humana, y comprende las etapas de:

(a) someter el extracto antigénico de vermes

adultos de *D. immitis* (5-8 μ g) a electroforesis en gel de poliacrilamida de 12%;

(b) electrotransferir las proteínas así separadas a nitrocelulosa; y

(c) hacer reaccionar las proteínas transferidas en Western blot con suero problema.

La etapa (c) del método de acuerdo con la invención se lleva a cabo empleando sueros control positivo y negativo, siguiendo el siguiente protocolo:

- Bloquear la nitrocelulosa con BSA durante 1 hora a temperatura ambiente para evitar reacciones inespecíficas.

- Incubar la nitrocelulosa con suero humano problema diluido 1:40 en PBS, durante una noche, a temperatura ambiente.

- Retirar el suero y lavar 3 veces con PBS-0,05% Tween 20, durante 5 minutos cada vez.

- Incubar la nitrocelulosa con anti-IgG antihumana marcada con peroxidada, a dilución 1:550, durante 2 horas a temperatura ambiente.

- Retirar la anti-IgG y lavar la nitrocelulosa como en el caso anterior. Realizar un último lavado sólo con PBS.

El revelado de la reacción se realiza incubando la nitrocelulosa con el sustrato (4-cloronaftol) entre 15 min. y 1 hora a temperatura ambiente y se detiene la reacción con H₂O destilada.

La reacción se considerará positiva si el suero problema reacciona con una proteína de 22 kDa del extracto antigénico de adultos de *D. immitis*, lo que producirá una fuerte banda de coloración en dicho rango de Pm. La reacción que ocurre con otras proteínas del parásito no es definitiva de positividad a dirofilariosis pulmonar humana.

La invención se ilustra a continuación por los siguientes experimentos los cuales no han de ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Experimento 1.

Este experimento se diseñó para determinar la fuente mas idónea de antígeno.

Se empleó un panel de 96 sueros humanos agrupados en varias categorías: 1. Sueros procedentes de un área libre de dirofilariosis (controles negativos). 2. Sueros de residentes en el área endémica, sin alteraciones pulmonares. 3. Sueros de pacientes previamente diagnosticados de dirofilariosis pulmonar. 4. Sueros de pacientes con otras parasitosis (hidatidosis y toxocariosis), carcinoma pulmonar y tuberculosis.

Se probaron dos tipos de antígenos: extracto de antígenos somáticos de adultos (ASA) y productos excretorios/ secretorios (E/S) de adultos de *D. immitis*.

El panel de sueros se enfrentó en ELISA contra ambos antígenos.

Los resultados obtenidos demuestran que los antígenos E/S tienen mucha sensibilidad para detectar casos de seropositivos sin nódulo, pero

reaccionan mal con los sueros de dirofilariosis pulmonar. Por el contrario, los antígenos ASA presentan poca sensibilidad para infestaciones sin alteración pulmonar, pero reaccionan fuertemente con todos los sueros de dirofilariosis pulmonar analizados.

En consecuencia se determinó continuar los estudios con el antígeno ASA.

Experimento 2.

Este experimento se diseñó para localizar, en los antígenos ASA, polipéptido/s con las características previamente señaladas.

Se empleó un grupo de 21 sueros representativos de cada una de las categorías del panel empleado en el experimento anterior.

Antígenos ASA se sometieron a electroforesis en gel de poli(acrilamida) para separar los polipéptidos que componen dicho extracto antigénico. Estos polipéptidos se transfirieron a nitrocelulosa y se enfrentaron en enzimoimmuno electrotransfer blot (EITB) a los 21 sueros seleccionados.

Este análisis puso de manifiesto la existencia del polipéptido según la invención con un Pm aproximado de 22 kDa (denominado Di22), que produce una fuerte banda de precipitado al reaccionar con los sueros de dirofilariosis pulmonar. Sin embargo no reacciona con los sueros de infestación por *D. immitis* sin nódulo pulmonar, ni con los sueros de pacientes con otras enfermedades parasitarias y no parasitarias.

Experimento 3.

Este experimento se diseñó para determinar la especificidad de fase de polipéptido, según la invención.

Tres conejos de raza Albina de Nueva Zelanda se inmunizaron respectivamente con tres dosis de tres antígenos diferentes de *D. immitis*: ASA y E/S de adultos, y antígeno somático de L3 (SL3). Se obtuvo suero de cada uno, previamente a la inmunización y un mes después de la última dosis.

Estos sueros se enfrentaron en EITB al antígeno ASA para determinar cual de ellos reaccionaba con Di22.

Solamente el suero inmunizado con antígeno ASA precipitó Di22, indicando que los otros dos conejos no habían desarrollado anticuerpos contra él, porque no se encuentra en el E/S ni en el SL3.

Experimento 4.
Demostrada la existencia del polipéptido según la invención fuertemente inmunógeno y capaz de reaccionar específicamente con sueros de pacientes de dirofilariosis pulmonar, se diseñó un cuarto experimento a gran escala para probar su especificidad.

Se empleó un panel de 232 sueros de diferentes enfermedades pulmonares, y 21 de parasitosis diferentes a la dirofilariosis. Entre los primeros se analizaron sueros de pacientes con: Sarcoidosis, IPE (infiltrados pulmonares con eosinofilia), FPI (fibrosis pulmonar idiopática), artritis reumatoide, carcinoma pulmonar, adenocarcinoma con afección pulmonar, hem siderosis, VIH+, VIH con *Pneumocystis*, tuberculosis, bronquiectasias, bronquiolititis obliterante con neumonía focal, proteinosis alveolar, melanoma con metástasis pulmonar, silicosis, infecciones fúngicas, arteritis temporal, Hodgkin, nódulos pulmonares de etiología desconocida, asma, fibrosis postneumónica,

fiebre Q, pneumonitis por *Haemophilus*, y con patología desconocida.

Entre los segundos se analizaron sueros de pacientes con toxocariosis (larva visceral emigrante), triquinosis, teniosis, fasciolosis, esquistosomiasis, filariosis por *Wuchereria*, *Brugia malayi* y *Onchocerca volvulus* y con nódulos cutáneos debidos a *D. immitis*.

Todos estos sueros se analizaron mediante EITB frente a antígenos ASA para determinar su reactividad a Di22.

El antígeno Di22 es reconocido por los sueros de individuos con dirofilariosis cutánea por *D. immitis*, un suero de onchocercosis y otro de toxocariosis. Ningún otro suero de pacientes con parasitosis, ni con enfermedades pulmonares no parasitarias reconoce el antígeno Di22 en EITB.

Los experimentos realizados con sueros de pacientes con una amplísima gama de enfermedades parasitarias y no parasitarias, han demostrado una gran especificidad del sistema EITB-Di22 para la dirofilariosis humana (superior al 95%). La reactividad de Di22 con sueros de pacientes con nódulos cutáneos debidos a *D. immitis* es normal, ya que estos pueden estar producidos por la misma fase evolutiva que los nódulos pulmonares. Además su diferente localización no plantea problemas de diagnóstico diferencial. Lo mismo le ocurre a los pacientes de toxocariosis y onchocercosis, ya que estos parásitos no producen ninguna patología pulmonar semejante a la de dirofilariosis. Si tenemos en cuenta estas cuestiones la especificidad del sistema EITB-Di22 alcanzaría, en estos experimentos, el 100%.

El método propuesto según la invención permite incluso diferenciar entre casos de infestación con fases del parásito previas al adulto, que no producen alteraciones pulmonares y los casos de dirofilariosis pulmonar.

La sensibilidad está asegurada por el carácter altamente inmunógeno de Di22, que produce fuertes bandas de precipitado con los sueros de pacientes con nódulos pulmonares dirofilarióticos.

Bibliografía

1. *Journal Thoracic Cardiovascular Surgery*, 97:303-308(1989)
2. *Proceedings of the Heartworm Symposium*. 1974
3. *Proceedings of the Heartworm Symposium*. 1986
4. *Australian Veterinary Journal*, 55:265-274 (1979)
5. Dirofilariosis en: *Parasitic Zoonoses*, vol II, CRC Press Inc., Florida, 1982
6. *Journal Medical Entomology*, 26:489-490 (1989)
7. *Momentum*, 3: 11-12 (1988)
8. *Momentum*, 3:9-10 (1988)
9. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31:302-308 (1982)
10. *J.UOEH* 9: 233-242 (1987)

- | | |
|--|--|
| <p>11. <i>Australian Veterinary Journal</i>, 55:265-274 (1979)</p> <p>12. <i>Journal Medical Entomology</i>, 26: 489-490 (1989)</p> <p>13. <i>Journal Allergy Clinical Immunology</i>, 71: 115(1983)</p> <p>14. <i>Tropical Medicina and Parasitology</i>, 42: 106-108(1991)</p> <p>15. <i>Veterinary Research Communications</i> (en prensa)</p> <p>16. <i>American Journal Tropical Medicine and Hygiene</i>, 34: 1141-1143 (1985)</p> | <p>17. <i>Southern Medical Journal</i>, 77: 372-374 (1984)</p> <p>18. <i>Acta Cytologica</i>, 29: 19-22 (1985)</p> <p>19. <i>Z.Parasitenkde</i>, 71: 561-563 (1985)</p> <p>20. <i>American Journal of Medicine</i>, 80: 161-164(1986)</p> <p>21. <i>Journal Infectious Diseases</i>, 165: 398-399 (1992)</p> <p>22. <i>Clinical Investigator</i>, 70: 437-440 (1992)</p> <p>23. <i>Journal of Helminthology</i>, 66: 220-226(1992)</p> |
|--|--|

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico in vitro de la dirofilariosis pulmonar humana, mediante el uso del test serológico de enzimoimmuno-electrotransfer blot (EITB) y suero del individuo sospechoso de padecer dirofilariosis pulmonar humana, **caracterizado** porque comprende las etapas de

- (a) someter el extracto antigénico de vermes adultos de *D. immitis* a electroforesis en gel de poliacrilamida de 12%;
- (b) electrotransferir las proteínas así separadas a nitrocelulosa;
- (c) hacer reaccionar las proteínas transferidas a nitrocelulosa con suero problema; y
- (d) revelar la reacción por incubación de la ni-

trocelulosa con un sustrato y posterior detención de la reacción con agua destilada.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como suero problema se emplean sueros de control positivo y de control negativo.

3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque en la etapa (d) la reacción se considera positiva si el suero problema reacciona con una proteína de 22 kDa del extracto antigénico de adultos de *D. immitis*, lo que producirá una fuerte banda de coloración en dicho rango de Pm.

4. Método según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la reacción que ocurre con otras proteínas, distintas de dicha proteína de 22 kDa, del parásito no es definitiva de positividad a dirofilariosis pulmonar humana.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/535

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	A. MURO et al. Differential recognition of <i>Dirofilaria immiter</i> antigen by human IgC and IgM positive sero. Preliminary data, based on EITB analysis. Prop. Med. Parasitol 43 (1992) 130-131	1-4
A	G. RICHARD YAMAGATA et al. Immunoglobuline E recognition of <i>Dirofilaria immiter</i> antigen s is more specific than immunoglobuline C. Veterinary Parasitology, 44 (1992) 223-245	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

30.05.96

Examinador

M. Ybarra Fernández

Página

1/1