

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 936**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2011 PCT/EP2011/064854**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12028594**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2011 E 11748961 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2612152**

54 Título: **Método para diagnosticar la peritonitis infecciosa y predecir la gravedad y el resultado de la misma en humanos**

30 Prioridad:

**31.08.2010 EP 10174641**

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

**25.03.2021**

73 Titular/es:

**OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT  
MAGDEBURG (50.0%)  
-Medizinische Fakultät- Leipziger Strasse 44  
39120 Magdeburg, DE y  
UNIVERSITÄT ZÜRICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HALANGK, WALTER;  
GRAF, ROLF;  
GUKASJAN, RAPHAEL y  
SCHULZ, HANS-ULRICH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 813 936 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar la peritonitis infecciosa y predecir la gravedad y el resultado de la misma en humanos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método de predicción y/o diagnóstico de una infección intraabdominal en humanos, en particular para predecir el desarrollo de peritonitis infecciosa y absceso intraabdominal, basado en el nivel de proteína de cálculos pancreáticos/proteína regeneradora (PSP/reg) en fluidos corporales. La invención permite clasificar a los pacientes según el riesgo.

**Antecedentes de la invención**

10 La peritonitis denota inflamación del peritoneo por cualquier causa, infecciosa o no. Puede considerarse como un equivalente localizado del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). La peritonitis se define según su causa y extensión. Las infecciones intraabdominales denotan la peritonitis causada por bacterias (por ejemplo, un proceso inflamatorio local iniciado por bacterias y sus toxinas) y pueden considerarse como el equivalente localizado de la sepsis sistémica. Se caracterizan por la amplia variedad de causas y la gravedad de la infección. Las complicaciones infecciosas intraabdominales son una causa importante de morbilidad y mortalidad del paciente en la unidad de cuidados intensivos (UCI).

15 La peritonitis infecciosa puede clasificarse como primaria, secundaria o terciaria. En la peritonitis primaria (también llamada peritonitis bacteriana espontánea), la fuente de infección no surge del tracto gastrointestinal y no existe un trastorno anatómico identificable de las vísceras intraabdominales. La peritonitis primaria es causada principalmente por una enfermedad hepática crónica, como la cirrosis. Por el contrario, la peritonitis secundaria se debe a una infección de las vísceras abdominales y puede surgir como consecuencia de perforación, necrosis isquémica o lesión penetrante. La peritonitis terciaria se define como la peritonitis que persiste o recurre después de más de un procedimiento fallido de control de la fuente, y es muy frecuente en pacientes que requieren ingreso en la unidad de cuidados intensivos por infecciones abdominales graves.

20 Es importante que los médicos discriminen a los pacientes que padecen una infección intraabdominal local de los pacientes que padecen una infección intraabdominal con una reacción sistémica (sepsis abdominal). Hasta el 40% de los pacientes con peritonitis pueden desarrollar sepsis abdominal. Debido al estándar heterogéneo de sepsis abdominal, es difícil definir con precisión la enfermedad y evaluar su gravedad. Por lo tanto, el diagnóstico preciso se ve obstaculizado notablemente.

25 Desde un punto de vista clínico, se distinguen dos tipos principales de infecciones intraabdominales: sin complicaciones y complicadas. En una infección intraabdominal sin complicaciones, el proceso infeccioso implica un solo órgano y no se produce alteración anatómica. Por el contrario, en infecciones intraabdominales complicadas, el proceso infeccioso progresa más allá del órgano que es la fuente de infección y causa peritonitis localizada, también conocida como absceso abdominal (es decir, una infección intraabdominal que se ha confinado dentro del abdomen cavidad), o peritonitis difusa (es decir, diseminación no contenida de la infección). La peritonitis difusa se caracteriza por una alta mortalidad y requiere celiotomía urgente.

30 Actualmente, el diagnóstico de peritonitis es principalmente clínico, en particular para casos quirúrgicos (por ejemplo, apendicitis, úlcera péptica perforada, fuga anastomótica después de la cirugía, intestino estrangulado). El diagnóstico de casos con ascitis requiere paracentesis para el recuento de células polimorfonucleares (PMN), que actualmente es el método estándar de oro para la peritonitis bacteriana espontánea. Se están introduciendo otros métodos de detección, como las tiras reactivas de leucocitos esterasa o lactoferrina. Desafortunadamente, la necesidad de tomar muestras de ascitis es un inconveniente importante para la mayoría de las técnicas de diagnóstico no clínicas. De hecho, este método (i) requiere la presencia de ascitis, (ii) exige un análisis que requiere mucho tiempo, (iii) implica procedimientos repetitivos y extra invasivos (paracentesis). Además, el método actual utilizado para diagnosticar la peritonitis bacteriana espontánea se basa en un recuento manual de PMN de líquido ascítico, un procedimiento costoso y que lleva mucho tiempo y que no siempre está disponible en situaciones de emergencia. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos métodos de diagnóstico basados en suero, es decir, que no requieran paracentesis.

35 La proteína de cálculo pancreática/proteína regeneradora (PSP/reg) pertenece a una familia de proteínas de unión a lectina que se identificaron inicialmente en pacientes con pancreatitis (L. Multigner et al., Gastroenterology 1985, 89: 387-391) PSP/reg ha sido estudiado predominantemente en el páncreas. En condiciones de pancreatitis aguda o crónica, está altamente regulada y puede aparecer en el suero (W. Schmiegel et al., Gastroenterology 1990, 99: 1421-1430) Los niveles séricos también se elevan en varias enfermedades gastrointestinales (Satomura et al., J. Gastroenterol 1995, 30: 643-650) La función de PSP/reg todavía es muy debatida, pero generalmente se supone que está implicada en la promoción de la proliferación celular durante los procesos regenerativos (Y. Kinoshita y col., J. Gastroenterol 2004, 39: 507-513).

40 Aunque esta proteína es un producto de secreción, su expresión no es inducida solo por la dieta. En pacientes con trauma, se ha demostrado que la PSP/reg está regulada en sangre después del trauma, y que el nivel de PSP/reg

está relacionado con la gravedad de la inflamación. En particular, aumenta mucho en pacientes durante la sepsis (M. Keel y col., Crit Care Med. 2009, 37 (5): 1642-1648).

Recientemente se demostró que el nivel de PSP/reg en el suero sanguíneo es un indicador confiable de sepsis sistémica (documento WO 2009/030456). La Solicitud de Patente SU 1 560 084 describe métodos para diagnosticar peritonitis que implican la medición de la presión arterial sistólica y venosa en el intestino delgado.

### Sumario de la invención

La presente descripción se refiere a un método de predicción y/o diagnóstico de una infección intraabdominal en humanos, en particular para la predicción del desarrollo de peritonitis causada por bacterias o virus, y las complicaciones clínicas relacionadas y el resultado, tales como la subsiguiente falla orgánica y la muerte, en donde el nivel de proteína de cálculo pancreático/proteína regeneradora (PSP/reg) se determina en una muestra de fluido corporal, y un alto nivel es indicativo del desarrollo y de la gravedad de la sepsis por peritonitis infecciosa en las primeras etapas de la enfermedad. Además, en la presente descripción, los altos niveles de PSP/reg predicen la supervivencia en pacientes con peritonitis y se correlacionan con las puntuaciones de gravedad clínica.

La presente invención se define según las reivindicaciones adjuntas.

### Breve descripción de las figuras

*Figura 1: Determinación de valores PSP/reg en suero de pacientes al ingreso al hospital con sospecha de peritonitis.*

C = control, P = peritonitis, N = ninguno, L = localizado, D = difuso, S = supervivientes, NS = no supervivientes.

Los pacientes fueron categorizados retrospectivamente:

Figura 1a: pacientes sin peritonitis infecciosa (C, n = 44) y pacientes con peritonitis infecciosa (P, n = 88). Valores de PSP/reg ( $\log_{10}$  ng/mL) de los tres grupos se representan gráficas de cajas con la media y el intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó mediante el método paramétrico (prueba t no emparejada); p = significancia.

Figura 1b: pacientes sin infección (N, n = 44), pacientes con infección intraabdominal local (L, n = 24) y pacientes con infección intraabdominal difusa (D, n = 64). Valores de PSP/reg ( $\log_{10}$  ng/mL) de los tres grupos se representan gráficas de cajas con la media y el intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó mediante el método paramétrico (prueba t no emparejada); p = significancia, \* p = valores de p para infección difusa frente a no infección.

Figura 1c: pacientes sin insuficiencia orgánica (0, n = 69), pacientes con insuficiencia de 1 a 3 órganos (1-3, n = 57) y pacientes con insuficiencia de más de 3 órganos (> 3, n = 6). Valores de PSP/reg ( $\log_{10}$  ng/mL) de los tres grupos se representan gráficas de cajas con la media y el intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó mediante el método paramétrico (prueba t no emparejada); p = significancia, \* p = valores de p para insuficiencia orgánica frente a no insuficiencia orgánica > 3.

Figura 1d: supervivientes (S, n = 107), no supervivientes (NS, n = 25). Valores de PSP/reg ( $\log_{10}$  ng/mL) de los dos grupos se representan gráficas de cajas con la media y el intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó mediante el método paramétrico (prueba t no emparejada); p = significancia.

*Figura 2: Curvas de característica operativa del receptor*

eje x: especificidad 1, eje y: sensibilidad

Figura 2a: Curva de característica operativa del receptor para la capacidad de PSP de discriminar entre pacientes sin (n = 44) y con (n = 88) peritonitis infecciosa.

Figura 2b: Curva de característica operativa del receptor para la capacidad de PSP de discriminar entre pacientes sin (n = 69) y con (n = 63) insuficiencia orgánica

Figura 2c: Curva de característica operativa del receptor para la capacidad de PSP de discriminar entre supervivientes (n = 107) y no supervivientes (n = 25) de peritonitis infecciosa.

*Figura 3: Correlación de puntuación APACHE y niveles séricos de PSP/reg al ingreso en la UCI (p < 0.001) en 137 pacientes.*

PSP/reg fue logaritimizado para demostración gráfica. eje x: puntuación APACHE, eje y: PSP/reg ( $\log_{10}$  ng/ml).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método de predicción y/o diagnóstico de una infección intraabdominal en humanos, en particular para la predicción del desarrollo de peritonitis de origen infeccioso, en donde el nivel de proteína

de cálculos pancreáticos/proteína regeneradora (PSP/reg) se determina en una muestra de fluido corporal, p. ej. suero o plasma, y un alto nivel es indicativo del desarrollo y de la gravedad de la peritonitis infecciosa en las primeras etapas de la enfermedad. En particular, un nivel alto es indicativo del desarrollo de una peritonitis infecciosa, mientras que un nivel intermedio es indicativo del desarrollo de un absceso intraabdominal.

- 5 Como se define aquí, la "peritonitis" es una inflamación de la membrana peritoneal causada por razones infecciosas o no infecciosas. La gran mayoría de las peritonitis clínicamente significativas es de origen infeccioso causado por bacterias.

10 Como se define aquí, "infección intraabdominal" denota peritonitis causada por bacterias (p. ej., un proceso inflamatorio local iniciado por bacterias y sus toxinas) o virus. La peritonitis infecciosa puede considerarse como el equivalente localizado de la sepsis sistémica. Debido al estándar heterogéneo de sepsis abdominal (el término generalmente dado a la sepsis que se origina en el abdomen), es difícil definir la enfermedad con precisión o evaluar su gravedad, lo que impide el progreso del diagnóstico. Es importante que los médicos discriminen a los pacientes que padecen una infección intraabdominal local de aquellos que sufren una infección intraabdominal con una reacción sistémica.

15 La peritonitis infecciosa puede clasificarse como primaria, secundaria o terciaria. En la peritonitis primaria (también llamada peritonitis bacteriana espontánea), la fuente de infección no surge del tracto gastrointestinal y no existe un trastorno anatómico identificable de las vísceras intraabdominales. La peritonitis primaria es causada principalmente por una enfermedad hepática crónica, tal como la cirrosis. Por el contrario, la peritonitis secundaria se debe a una infección de las vísceras abdominales y puede surgir como consecuencia de perforación, necrosis isquémica o lesión penetrante. La peritonitis terciaria se define como la peritonitis que persiste o recurre después de más de un procedimiento fallido de control de la fuente, y es muy frecuente en pacientes que requieren ingreso en la unidad de cuidados intensivos por infecciones abdominales graves.

Aún debe distinguirse la sepsis de la peritonitis, ya que, en la sepsis, el origen de la infección no es omnipresente y su presencia es amplia, mientras que la peritonitis implica una inflamación/infección local, intraabdominal.

25 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *ex vivo* de predicción y/o diagnóstico de una infección intraabdominal en humanos. En particular, el presente método según la invención permite la detección del desarrollo y la predicción de la gravedad de la peritonitis de origen infeccioso. También permite el pronóstico de peritonitis de origen infeccioso. Los métodos según la presente invención comprenden determinar el nivel de PSP/reg en una muestra de fluido corporal aislada, p. ej., suero o plasma, en donde dicho nivel es indicativo de la gravedad de la peritonitis infecciosa en las primeras etapas de la enfermedad y de las complicaciones y el riesgo de mortalidad relacionados con dichas infecciones.

30 Como se define aquí, "paciente" se refiere a cualquier animal mamífero, incluyendo humanos, perros, gatos, vacas, cabras, cerdos, cerdos, ovejas y monos. Los pacientes son preferiblemente humanos.

35 Como se define aquí, "PSP/reg" se refiere a la proteína de cálculos pancreáticos humana, también llamada proteína del gen regenerador (REG) I o litostatina o proteína de hilo pancreático (Gross y col., J. Clin. Invest. 1985, 76: 2115-2126) y puede tener la isoforma alfa (número de secuencia de Uniprot: P05451, también identificado aquí como SEQ ID NO: 1) o beta (número de secuencia de Uniprot: P48304, también identificado aquí como SEQ ID NO: 2).

40 Como se define aquí, "muestra corporal" se refiere a cualquier muestra que se obtiene del cuerpo del paciente. La muestra corporal incluye muestras de fluidos corporales y extractos de tejido sólido o de materia fecal. Las muestras de fluidos corporales incluyen, por ejemplo, muestras de sangre completa, suero, plasma, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido lagrimal, sudor o, leche.

45 Un aspecto de la invención se refiere a un método de pronóstico y/o diagnóstico de peritonitis en un paciente, preferiblemente un ser humano, en el que el nivel de proteína de cálculos pancreáticos/proteína regeneradora (PSP/reg) se determina en una muestra de fluido corporal o en un tejido corporal sólido, y un alto nivel es indicativo del desarrollo y la gravedad de la enfermedad.

En un aspecto adicional del método de la invención, la peritonitis es causada por bacterias, virus, hongos o parásitos, y es peritonitis primaria, secundaria o terciaria.

50 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un método *ex vivo* de pronóstico y/o diagnóstico de infecciones intraabdominales en un paciente, que comprende determinar el nivel de proteína de cálculos pancreáticos/proteína regeneradora (PSP/reg) en una muestra de fluido corporal de dicho paciente. El paciente es preferiblemente un humano.

En un aspecto preferido, el método de la invención es para detectar el desarrollo de peritonitis en un paciente.

En otro aspecto del método de la invención, la proteína PSP/reg tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Según otro aspecto, el método de la invención es un método de diagnóstico *in vitro*.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método *ex vivo* de pronóstico y/o diagnóstico de infecciones intraabdominales en un paciente, o a un método *ex vivo* para detectar el desarrollo de peritonitis en un paciente, que comprende:

- 5 a) proporcionar una muestra de fluido corporal de dicho paciente;
- b) determinar el nivel de PSP/reg en dicha muestra;
- c) comparar el nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) con un valor de referencia;

en donde un nivel más alto de PSP/reg determinado en la etapa b), en comparación con el valor de referencia, es indicativo de la gravedad de la infección intraabdominal y/o peritonitis y es predictivo del resultado.

- 10 En un aspecto específico de la invención, el valor de referencia es el nivel de PSP/reg medido en una muestra de fluido corporal de un paciente sin infección conocida o sospechada.

En otro aspecto específico de la invención, la muestra de fluido corporal es suero o plasma.

En otro aspecto de la invención, el valor de referencia es aproximadamente 20 ng/ml de PSP/reg en suero o plasma.

- 15 Los niveles de PSP/reg, indicativos del desarrollo y la gravedad de la peritonitis, dependen del líquido corporal elegido para la determinación. Los niveles séricos o plasmáticos están entre 25 y 30 ng/ml al ingreso a las unidades de cuidados intensivos (UCI) en pacientes con sospecha de peritonitis.

- 20 Más precisamente, la invención se refiere a un método de predicción y/o diagnóstico del desarrollo de peritonitis, en el que el nivel de PSP/reg se determina en suero o plasma, y un nivel de 25 ng/ml o más, en particular un nivel de 30 ng/ml o más, al ingreso a la UCI con sospecha de peritonitis o después de una cirugía abdominal, es indicativo del desarrollo de una peritonitis local o difusa, en donde un nivel de 50 ng/ml o más es indicativo de insuficiencia orgánica, y en donde un nivel de 400 ng/ml o más indica que el paciente tiene un alto riesgo de muerte.

Otros fluidos corporales que el suero o el plasma útiles para la determinación de los niveles de PSP/reg son, p. ej., sangre completa, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido lagrimal, sudor, leche o extractos de tejido sólido o de materia fecal.

- 25 En un aspecto preferido del método *ex vivo* de la invención, el nivel de PSP/reg determinado en el paso b) se determina el día de ingreso a la UCI y en días posteriores.

En un aspecto alternativo preferido del método *ex vivo* de la invención, el nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) se determina dentro de las 24 horas posteriores a la cirugía abdominal.

- 30 En un aspecto adicional del método de la invención, el nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) se determina dentro de las 24 horas posteriores a la cirugía abdominal y permite el triaje de los pacientes según el riesgo, en el que un nivel por debajo de 30 ng/ml es indicativo de que el paciente puede ser colocado en una unidad de cuidado intermedio o normal después de la cirugía, y en el que un nivel de 100 ng/ml o más indica que el paciente requiere cuidados intensivos y debe someterse a un tratamiento de infección o una nueva cirugía para limpiar el sitio de infección

- 35 Puede usarse cualquier método conocido para determinar el nivel de PSP/reg en los fluidos corporales. Los métodos considerados son, p. ej., ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoensayo (EIA), espectrometría de masas o análisis de microarrays. Dichos métodos cuando se usan para la detección del desarrollo de infección local o sistémica, en particular de la detección del desarrollo de sepsis, son un objeto adicional de la invención.

- 40 Un método preferido para la determinación de PSP/reg en fluidos corporales humanos, p. ej., suero o plasma, es un ELISA. En tal realización, el PSP/reg ELISA consiste en una matriz tipo sándwich: las placas de microtitulación convencionales están recubiertas con un tipo de anticuerpo ("primer" anticuerpo), dirigido contra PSP/reg. Después se bloquean las placas y se carga la muestra o el estándar. Después de la incubación, se aplica un tipo diferente de anticuerpo ("segundo" anticuerpo) contra PSP/reg. Un tercer anticuerpo que detecta el tipo particular del "segundo" anticuerpo, conjugado con un marcador adecuado, p. ej., se añade después una enzima para la detección cromogénica. Finalmente, la placa se desarrolla con un sustrato para el marcador con el fin de detectar y cuantificar el marcador, siendo una medida de la presencia y la cantidad de PSP/reg. Si el marcador es una enzima para la detección cromogénica, el sustrato es un sustrato generador de color de la enzima conjugada. La reacción de color se detecta en un lector de microplacas y se compara con los estándares.
- 45

- 50 Los pares adecuados de anticuerpos ("primer" y "segundo" anticuerpo) son cualquier combinación de anticuerpos de cobaya, rata, ratón, conejo, cabra, pollo, burro o caballo. Se prefieren los anticuerpos policlonales, pero también es posible usar anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos. Los más preferidos son los anticuerpos

5 monoclonales. Los marcadores adecuados son marcadores cromogénicos, es decir, enzimas que pueden usarse para convertir un sustrato en un compuesto fluorescente o coloreado detectable, marcadores espectroscópicos, p. ej., marcadores fluorescentes o marcadores que presentan un color visible, marcadores de afinidad que pueden ser desarrollados por otro compuesto específico para el marcador y que permiten una fácil detección y cuantificación, o cualquier otro marcador utilizado en ELISA estándar.

10 Otros métodos preferidos de detección de PSP/reg son radioinmunoensayo o inmunoensayo competitivo que usa un solo anticuerpo y detección de quimioluminiscencia en robots analíticos comerciales automatizados. También puede utilizarse fluorescencia mejorada con micropartículas, metodologías polarizadas con fluorescencia o espectrometría de masas. Dispositivos de detección, p. ej., microarrays, son componentes útiles como sistemas de lectura para PSP/reg.

15 PSP/reg es una proteína expresada en el páncreas y el intestino. Puede clonarse a partir de ARNm pancreático y subclonarse en un vector de expresión de levadura. La proteína puede expresarse bajo el control del promotor de alcohol deshidrogenasa (ADH). Un medio de expresión adecuado puede comprender metanol para inducir y mantener la secreción de PSP/reg. PSP/reg se purifica preferiblemente usando SP-Sepharose-celulosa por un gradiente de pH y sal. Dicho PSP/reg purificado se usa para preparar soluciones estándar para la comparación con los niveles de PSP/reg en fluidos corporales. Los anticuerpos policlonales contra la proteína pueden obtenerse de ratones, ratas, conejos, cabras, pollos, burros, caballos y cobayas u otros animales adecuados utilizando métodos estándar.

20 La invención se refiere además a un kit de piezas para la determinación de PSP/reg para el diagnóstico/predicción de infecciones intraabdominales que comprende, por ejemplo, aparatos, reactivos y soluciones estándar de PSP/reg. Los aparatos considerados son, p. ej., placas de microtitulación para ELISA, placas de ELISA recubiertas anteriormente y cubiertas de placas. Los reactivos son aquellos reactivos especialmente desarrollados y diseñados para la detección de PSP/reg. Las soluciones estándar de PSP/reg contienen preferiblemente PSP/reg sintetizado según las instrucciones a continuación. El kit de piezas puede contener hardware adicional, como pipetas, soluciones como tampones, soluciones de bloqueo y similares, filtros, tablas de colores e instrucciones de uso.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para detectar infección intraabdominal en pacientes según un método de la invención que comprende al menos un anticuerpo dirigido contra PSP/reg y reactivos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para predecir la gravedad de una infección de peritonitis en un paciente y el resultado del paciente según un método de la invención que comprende al menos un anticuerpo dirigido contra PSP/reg y reactivos.

30 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit según la invención para detectar el desarrollo de una infección abdominal local o difusa en un paciente, especialmente el desarrollo de peritonitis, más notablemente el desarrollo de sepsis, por ejemplo, en un método según la invención.

35 Los anticuerpos dirigidos contra PSP/reg pueden producirse mediante métodos estándar en el campo, incluyendo la producción de anticuerpos policlonales y la producción de anticuerpos monoclonales. Preferiblemente, los anticuerpos se dirigen contra una proteína PSP/reg que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales IgG1 de ratón.

40 La razón del aumento en los niveles séricos de PSP/reg durante el desarrollo temprano de la peritonitis infecciosa no se comprende completamente. En ratas, se observa un aumento en la síntesis de PSP/reg en ausencia de daño pancreático después del estrés (por ejemplo, anestesia). En un estudio reciente, se observó un aumento en la PSP/reg en correlación con el desarrollo de sepsis severa en un conjunto de pacientes humanos con trauma severo, pero ausencia aparente de daño pancreático (M. Keel y col., Crit Care Med. 2009, 37 (5): 1642-1648) Los datos se analizaron utilizando la estratificación asignada a pacientes con trauma sin infección, pacientes con infección y pacientes con sepsis. Los valores de PSP/reg en pacientes sin infección aumentaron ligeramente. En pacientes con politraumatismo e infección, los niveles de PSP/reg aumentaron aún más. Finalmente, los pacientes politraumáticos que presentan sepsis mostraron un gran aumento en la PSP/reg sérica. La aparición de PSP/reg en el suero sanguíneo implicaría una vía alterada, desviando la proteína del jugo pancreático hacia la sangre. También se ha demostrado que los miembros de la familia de unión a lectina (por ejemplo, proteína asociada a pancreatitis) son inducibles por las citocinas. Hay una acción fuerte y concertada de las citocinas después del trauma. No se comprende la complejidad de la respuesta de las citocinas, con la liberación de muchas citocinas diferentes. Por lo tanto, es probable que la PSP/reg reaccione a las citocinas que se generan bajo condiciones de estrés o trauma sistémico. Por el contrario, otras enzimas pancreáticas, p. ej., la amilasa y la lipasa parecen no estar reguladas por las citocinas, ya que su aparición en la sangre es solo el resultado de un desvío. Recientemente se demostró que el nivel de PSP/reg en el suero sanguíneo es un indicador confiable de sepsis sistémica. Ahora los niveles de PSP/reg en sangre también han demostrado ser un indicador confiable de peritonitis infecciosa. El aumento de PSP/reg en sangre podría implicar una respuesta específica al estrés.

Recientemente se ha demostrado que, a diferencia de otros indicadores de inflamación, los niveles de PSP/reg aumentan mucho en los pacientes mientras o antes de que aparezcan signos clínicos de sepsis sistémica. Actualmente se muestra que los pacientes que desarrollan peritonitis, una inflamación local de la membrana peritoneal, tienen

niveles elevados de PSP/reg. En particular, PSP/reg aumenta mucho en pacientes que desarrollan peritonitis con un mayor riesgo de mortalidad.

5 La detección y cuantificación de la PSP/reg sérica se logra p.ej., mediante un ELISA sandwich con un límite de detección inferior a 100 pg/ml. Los valores séricos normales están entre 5 y 20 ng/ml. Los valores séricos se correlacionan con la gravedad de la peritonitis. Pueden alcanzar más de 200 ng/ml antes de que estén disponibles los signos clínicos de sepsis abdominal. Estos valores permiten predecir si un paciente desarrollará peritonitis, si conducirá a insuficiencia orgánica, y en qué medida será grave y potencialmente mortal, y por lo tanto la necesidad de un tratamiento intensivo que incluya un costoso tratamiento con antibióticos y una estadía en cuidados intensivos. unidad (UCI). En comparación con los ensayos de diagnóstico disponibles comercialmente, el PSP/reg ELISA es un ensayo  
10 confiable para predecir la gravedad y el resultado en pacientes con peritonitis, particularmente para predecir si dicho paciente tiene una buena o mala probabilidad de supervivencia.

Los métodos de la invención y/o el kit según la invención son útiles para clasificar a los pacientes según grupos de riesgos con respecto a la gravedad y el resultado de la enfermedad de infección.

15 En pacientes con peritonitis, un nivel de PSP/reg, preferiblemente de una muestra obtenida del suero o plasma, inferior o igual a 30 ng/ml es predictivo de una buena posibilidad de supervivencia, mientras que un nivel de PSP/reg mayor o igual a 200 ng/ml, preferiblemente mayor que 250 ng/ml, más preferiblemente mayor o igual a 300 ng/ml, más preferiblemente mayor o igual a 400 ng/ml se asocia con un alto riesgo de mortalidad que podría ocurrir dentro de un período variable comprendidos entre 1 día y 3 años, por ejemplo, dentro de los 28 días posteriores a la hospitalización.

20 Como consecuencia, el seguimiento y la atención regulares e intensivos, que posiblemente incluyen el tratamiento con antibióticos y la estadía prolongada, deben aplicarse a pacientes con peritonitis que pertenecen al grupo(s) de alto riesgo.

25 En pacientes de cirugía abdominal, un nivel de PSP/reg, preferiblemente de una muestra obtenida del suero o plasma dentro de las 24 horas posteriores al procedimiento de la cirugía, por debajo o igual a 30 ng/ml es predictivo de una buena probabilidad de supervivencia, mientras que un nivel de PSP/reg superior o igual a 50 ng/ml, preferiblemente superior a 80 ng/ml, más preferiblemente superior o igual a 100 ng/ml, más preferiblemente superior o igual a 200 ng/ml se asocia con un alto riesgo de complicaciones posteriores a la cirugía relacionadas con la infección que podrían ocurrir dentro de un período variable comprendido entre 1 día y 10 días después de la cirugía. Como consecuencia, la decisión basada en los niveles de PSP/reg de aplicar un seguimiento y cuidado regular, intermedio o intensivo, posiblemente incluyendo tratamiento con antibióticos, estadía prolongada o cirugía, debe tomarse para pacientes con  
30 peritonitis que pertenecen al grupo(s) de alto riesgo(s).

## Ejemplos

### **Aislamiento y subclonación de PSP/reg**

35 Para obtener ADNc para la producción de anticuerpos específicos de PSP/reg, tal ADNc se prepara mediante transcripción inversa de ARNm pancreático usando métodos de laboratorio de última generación. Se realiza una reacción de PCR que usa cebadores específicos para la secuencia que codifica PSP/reg y amplifica selectivamente el ADNc de PSP/reg. La reacción de PCR se repite después con el cebador de alargamiento para añadir una secuencia específica para la inserción en el vector de transfección de *Pichia pastoris*. El cebador está diseñado para fusionar la región de codificación del péptido señal del factor de apareamiento alfa con un sitio KEX2 y la región de codificación del PSP/reg humano maduro. Subclonar en el vector de *Pichia pastoris* es un procedimiento de dos pasos. Primero,  
40 el producto de PCR se liga al vector pCR2.1 (Invitrogen, TAcloning) y se verifica la secuencia. Después, el producto de PCR se escinde por digestión de restricción XhoI/NotI y se liga al vector de transferencia pPIC9 (Invitrogen). La cepa KM71 de *Pichia pastoris* (Invitrogen) se transforma y se selecciona el clon más productivo para la expansión y producción de proteína recombinante.

### **Cebadores utilizados para amplificación por PCR y subclonación**

45 PSP/reg/reg1 alfa humano

Cebadores directos

5' GAAAAGACAAGAGGCCCCAGACAGAGTT 3' (SEQ ID NO:3)

5' GATCTCTCGAGAAAAGACAAGAGGCCCCAGA 3' (elongación) (SEQ ID NO:4)

Inverso

50 5' CTAGTTTTTGAACCTTGCATAC 3' (SEQ ID NO:5)

PSP humano/reg/reg1 beta

Cebadores directos

5' GAAAAGACAGGAGTCCCAGACAGAGCTG 3' (SEQ ID NO:6)

5' GTATCTCTCGAGAAAAGACAGGAGTCCCAGAC 3' (elongación) (SEQ ID NO:7)

5 Cebador inverso

5' ATCTGCAGTCTAGAATTCTGCAGGACCAGTTCTAGAC 3' (SEQ ID NO:8)

### **Expresión de proteínas a gran escala**

Usando una sola colonia, 25 ml de BMG (glicerol mínimo tamponado, fosfato de potasio 100 mM pH 6,0, 1,34% de base de nitrógeno de levadura,  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina, 1% de glicerol) se inocula en un matraz con deflector de 250 ml y se cultiva a 29 °C en una incubadora con agitación (300 rpm) durante la noche. Se utilizan 10 ml de este cultivo para inocular 1 litro de BMG en un matraz con deflector de 3 litros y crecer a 29 °C (300 rpm) durante la noche. Las células se cosechan por centrifugación a 1500-3000xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. La expresión se induce resuspendiendo las células en 1/5 de volumen (200 ml) de BMM (metanol mínimo tamponado, BMG en el que el glicerol se reemplaza por metanol al 0,5%) en el mismo matraz desconcertado. Se añade metanol al 100% para lograr una concentración de 0,5% (1 ml) cada 24 horas hasta que se alcanza el tiempo óptimo de inducción. Las células se cosechan por centrifugación a 1500-3000xg a temperatura ambiente. El sobrenadante del medio se recoge y se congela hasta la purificación del péptido.

El polipéptido se purifica a partir de sobrenadantes del medio. Los sobrenadantes del medio se diluyen 1:3 con agua destilada. El pH se ajusta a pH 3,5 con HCl. El sobrenadante del medio se aplica después a una columna SP-Sepharose y se eluye mediante un gradiente de sal y pH (LiCl 10 mM, MES 50 mM, tampón inicial pH 5,3, LiCl 2 M, MES 50 mM, tampón final pH 6,3). Las fracciones se recogen y analizan por electroforesis en gel SDS. Las fracciones con los contenidos de proteína más altos y más puros se combinan y dializan contra HEPES 10 mM, pH 7,5. La secuencia del polipéptido se verifica por secuenciación N-terminal y la concentración se evalúa por análisis de aminoácidos.

### **ELISA de PSP/reg**

Para determinar el PSP/reg total, puede usarse un ELISA sandwich sobre la base de un antisuero de cobaya generado contra PSP/reg humano recombinante y un antisuero de conejo contra la misma proteína. Para mejorar la especificidad y la sensibilidad del anticuerpo de conejo, las IgG se purifican por absorción en una columna de perlas de proteína A (HiTrap®, Pharmacia): una columna HiTrap® se equilibra con 200 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a pH 7. El antisuero de conejo se ajusta al pH con la misma solución tampón (concentración final 20 mM) y después se carga en la columna, que después se lava con Tris/HCl 100 mM y 10 mM pH 8 consecutivamente. La fracción de IgG se eluye con ácido cítrico 0,1 M pH 3. Las fracciones eluidas se neutralizan inmediatamente con Tris/HCl 1 M pH 8,9.

Se recubren las placas de microtitulación de 96 pocillos (placas Costar EIA, fondo plano, alta unión) durante la noche a 4 °C con fracción de IgG de PSP/reg anti-rata de cobaya, diluida 1:500 en TBS (100 µl/pocillo). Después de una etapa de lavado, la placa se bloquea con 150 µl de BSA/TBS al 1% durante una hora, que después se reemplaza por 100 µl de diferentes concentraciones estándar de PSP/reg humano recombinante (0, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,5, 3,5 o 5,0 ng/ml) o muestras de 100 µl de muestra diluida. Las muestras y los estándares se cargan por duplicado y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar repetidamente, la placa se incuba durante 1 hora con 100 µl de IgG de PSP/reg anti-rata de conejo, diluida 1:500. Se inicia otra etapa de lavado antes de una incubación de 30 minutos con 100 µl de un anticuerpo IgG anti-conejo monoclonal de ratón disponible comercialmente (fracción de IgG conjugada con fosfatasa alcalina de ratón anti-conejo, diluida 1:1000; comprada en Sigma). La placa se lava nuevamente, y se añade un sustrato de fosfatasa soluble, fosfato disódico de p-nitrofenilo (tabletas Sigma 104®), añadido en tampón de fosfatasa alcalina (Tris/HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl 0,8 mM<sub>2</sub>). Después de un período de incubación de aproximadamente 20 minutos, se mide la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector de microplacas MRX (Dynatech Laboratories).

Todas las diluciones (excepto los anticuerpos de recubrimiento) se preparan en BSA/TBS al 1%. Todas las incubaciones a temperatura ambiente se llevan a cabo en un agitador rotativo de placas ELISA (Titramax 100, Heidolph, Bioblock Scientific). Todas las etapas de lavado se realizan con TBS/Tween 20 (0,05%, v/v), usando un lavador automático de placas de microtitulación (MRW, Dynatech Laboratories).

Las tasas de recuperación de PSP/reg recombinante en suero diluido de un voluntario sano son las siguientes: 71% a 1:10, 118% a 1:20 y 95% a dilución 1:40. La varianza intraplaca e interplaca es inferior al 5% y al 10%, respectivamente, para concentraciones dentro del intervalo del estándar (entre 0,1 y 3,5 ng/ml).



El ensayo se establece con PSP/reg1 alfa recombinante humano (SEQ ID NO: 1). PSP/reg1 beta recombinante (SEQ ID NO: 2), la segunda isoforma, se realizó utilizando la misma técnica. PSP/reg 1 beta es reconocido igualmente bien por el ELISA. Por lo tanto, el ELISA es específico para la conocida familia PSP/reg de proteínas.

#### **Ensayos a pacientes para probar el principio**

- 5 Se ha investigado si PSP/reg puede detectar infección y es predictivo de insuficiencia orgánica y pacientes con peritonitis de supervivencia después de una cirugía abdominal.

La población del estudio incluyó a 137 pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos, Universitätsklinikum Magdeburg, con sospecha de peritonitis, en un período de tiempo de enero de 2010 a abril de 2010. Se excluyeron los pacientes con lesión pancreática.

- 10 La Tabla 1 resume los datos demográficos y las puntuaciones de lesiones en el día del ingreso. La gravedad de las lesiones y la distribución por género fueron muy similares.

Tabla 1: Características de los pacientes incluidos

Características del paciente	Todos los pacientes n = 137	Sin peritonitis n = 46	Peritonitis n = 91	p valor <sup>†</sup>
Edad, mediana (IQR)	61 (50-72)	55 (50-65)	66 (50-72)	0,045
Género, n hombre/mujer (%)	75/61 (55%/45%)	22/23 (49%/51%)	53/38 (58%/42%)	0,198
Localización de peritonitis, n contenida/difusa (%)	26/65 (19%/52%)	-	26/65 (29%/71%)	-
APACHE II <sup>a</sup> , Puntuación	15 (11-22)	11 (8-13)	18 (14-26)	<0,001
Insuficiencia orgánica, n (%)	67 (49%)	6 (13%)	61 (67%)	<0,001
No supervivientes, n (%)	23 (17%)	0 (0%)	23 (25%)	<0,001
n: número.				
<sup>a</sup> APACHE II, fisiología aguda y evaluación de la salud crónica II				

#### **Estado sanguíneo de pacientes con peritonitis - Determinación de indicadores estándar de inflamación.**

- 15 Niveles de sangre de los indicadores de inflamación comúnmente utilizados, p. ej., IL-6 y procalcitonina (PCT) y la proteína C reactiva (PCR) se midieron al ingreso a la UCI para demostrar el grado de inflamación. Aunque todos estos parámetros aumentaron en pacientes con infecciones, PSP/reg alcanzó un nivel de significancia más alto en comparación con los otros parámetros (Tabla 2).

Tabla 2: Indicadores estándar de inflamación al ingreso.

Características del paciente	Todos los pacientes n = 137	Sin peritonitis n = 46	Peritonitis n = 91	p valor <sup>†</sup>
Recuento de glóbulos blancos (WCC)	14 (10-19)	13 (9-17)	15 (11-20)	0,079
Proteína C reactiva (ng/ml)	156 (58-249)	51 (33-86)	222 (143-291)	<0,001
Interleucina-6 (ng/ml)	42 (0-174)	0 (0-0)	88 (34-375)	<0,001
Procalcitonina (ng/ml)	0,5 (0,10-2,6)	0,1 (0,03-0,2)	1,07 (0,27-6,1)	<0,001
PSP/reg (ng/ml)	29 (16-204)	15 (11-23)	125 (25-419)	<0,0001
Mediana (IQR)				

**PSP/reg se regula al alza el desarrollo de peritonitis**

Anteriormente se demostró que los niveles séricos de PSP/reg aumentan en pacientes con trauma grave y sin lesión pancreática, y que este aumento es significativo en pacientes politraumáticos que presentan sepsis grave. El presente estudio tiene como objetivo evaluar los niveles séricos de PSP/reg de pacientes con peritonitis.

- 5 Cuando los datos se analizan utilizando la estratificación asignada a pacientes sin peritonitis y pacientes con peritonitis, los valores de PSP/reg al ingreso a la UCI en pacientes sin peritonitis son cercanos a los observados generalmente en individuos sanos (mediana: 15 ng/ml), mientras que los valores de PSP/reg aumentan significativamente en pacientes con peritonitis (mediana: 125 ng/ml). Por lo tanto, PSP/reg discrimina a los pacientes que desarrollan peritonitis de aquellos que no (Figura 1a).
- 10 Además, cuando los datos se analizan mediante la estratificación asignada a pacientes con peritonitis con infección local (absceso intraabdominal) y pacientes con infección difusa (sepsis intraabdominal), los valores de PSP/reg al ingreso a la UCI en pacientes con infección local aumentan en comparación con los observados en pacientes sin infección (mediana: 31 ng/ml frente a 15 ng/ml, respectivamente), y los valores de PSP/reg aumentan aún más en pacientes con infección difusa (mediana: 140 ng/ml). Por lo tanto, los niveles de PSP/reg permiten la discriminación entre peritonitis local y difusa (Figura 1b).
- 15

**Predicción de insuficiencia orgánica**

Además, cuando los datos se analizan utilizando la estratificación asignada a pacientes sin insuficiencia orgánica, insuficiencia de 1 a 3 órganos e insuficiencia de más de 3 órganos, los valores de PSP/reg al ingreso a la UCI en pacientes sin insuficiencia orgánica permanecen bajos (mediana: 19 ng/ml), pero aumentan notablemente en pacientes con hasta tres insuficiencias orgánicas (mediana: 183 ng/ml), y están dramáticamente elevados en pacientes con insuficiencia de más de tres órganos (mediana: 825 ng/ml). Por lo tanto, los niveles de PSP/reg predicen el alcance de las alteraciones de los órganos (Figura 1c).

- 20

**Los niveles de PSP/reg son predictores de resultados**

Además, cuando los datos se analizaron utilizando la estratificación según la supervivencia, los valores de PSP/reg al ingreso a la UCI fueron significativamente mayores en los no supervivientes (mediana [RIC]; 499 ng/ml [137-626], n = 23) en comparación con los supervivientes (24 ng/ml [14-132], n = 114; p = 0.011) (Figura 1d).

- 25

PSP/reg por debajo de 25 ng/ml al ingreso en la UCI fue el umbral más preciso para predecir la supervivencia. La sensibilidad fue del 53% y la especificidad del 100% para predecir la supervivencia (Tabla 4). Por el contrario, PSP/reg por encima de 400 ng/ml al ingreso en la UCI fue el mejor límite para predecir la muerte (sensibilidad: 52% de especificidad: 90%). Los valores predictivos positivos y negativos fueron 54% y 89%, en consecuencia. Los pacientes con PSP/reg por encima de 400 ng/ml al ingreso en la UCI tenían un alto riesgo de muerte dentro de los 28 días.

- 30

En el análisis de características operativas del receptor, el área bajo la curva de PSP/reg para la peritonitis infecciosa al ingreso en la UCI es del 86% (Figura 2a). Para la insuficiencia orgánica, el área bajo la curva de PSP/reg es 87% (Figura 2b). Finalmente, el área bajo la curva de PSP/reg para la predicción de la mortalidad/supervivencia al ingreso en la UCI fue de 0,847 es del 85% (Figura 2c).

- 35

En otras palabras, el aumento de PSP/reg en pacientes con una infección intraabdominal puede usarse como marcador sérico para predecir el desarrollo y la gravedad de la peritonitis y el resultado del paciente. Por lo tanto, la especificidad y la sensibilidad se resumen para dos valores de corte potenciales, p. ej., 25 y 30 ng/ml, al ingreso a la UCI. La especificidad es superior al 80 por ciento para valores de corte de 25 y 30 ng/ml, lo que indica que los pacientes pueden ser diagnosticados y clasificados por este método poco después de su ingreso a la UCI.

- 40

Tabla 3: Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos para dos puntos de corte de los niveles séricos de PSP/reg para pacientes con peritonitis con infección en comparación con pacientes sin infección.

Al ingreso	25 ng/ml	30 ng/ml
Sensibilidad	75%	67%
Especificidad	81%	95%
Valor predictivo positivo	89%	97%
Valor predictivo negativo	61%	59%

**Tabla 4:** Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos para dos puntos de corte de los niveles séricos de PSP para mortalidad/supervivencia

Día 0	25 ng/ml	30 ng/ml	400 ng/ml
Sensibilidad	100%	92%	52%
Especificidad	53%	64%	90%
Valor predictivo positivo	33%	37%	54%
Valor predictivo negativo	100%	97%	89%

El análisis se basa en los valores séricos de PSP/reg obtenidos al ingreso a la UCI.

5 **Evaluación de gravedad: PSP/reg correlacionado con APACHE**

PSP/reg correlacionó con APACHE II al ingreso a la UCI (coeficiente de correlación de intervalo de Spearman 0,621; p <0.001, Figura 3).

**Listado de secuencias**

- 10 <110> Otto-von-Guericke-Universitaet Magdeburg  
Universitaet Zuerich  
Halangk, Walter  
Graf, Rolf
- 15 <120> Método para analizar la peritonitis en humanos
- <130> P389A
- <150> EP10174641.0
- 20 <151> 31-08-2010
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1  
<211> 166  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- 30 <400> 1

ES 2 813 936 T3

Met Ala Gln Thr Ser Ser Tyr Phe Met Leu Ile Ser Cys Leu Met Phe  
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Ser Gln Gly Gln Glu Ala Gln Thr Glu Leu Pro Gln Ala  
 20 25 30

Arg Ile Ser Cys Pro Glu Gly Thr Asn Ala Tyr Arg Ser Tyr Cys Tyr  
 35 40 45

Tyr Phe Asn Glu Asp Arg Glu Thr Trp Val Asp Ala Asp Leu Tyr Cys  
 50 55 60

Gln Asn Met Asn Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu Thr Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Gly Ala Phe Val Ala Ser Leu Ile Lys Glu Ser Gly Thr Asp Asp Phe  
 85 90 95

Asn Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His  
 100 105 110

Trp Ser Ser Gly Ser Leu Val Ser Tyr Lys Ser Trp Gly Ile Gly Ala  
 115 120 125

Pro Ser Ser Val Asn Pro Gly Tyr Cys Val Ser Leu Thr Ser Ser Thr  
 130 135 140

Gly Phe Gln Lys Trp Lys Asp Val Pro Cys Glu Asp Lys Phe Ser Phe  
 145 150 155 160  
 Val Cys Lys Phe Lys Asn  
 165

- 5  
 <210> 2  
 <211> 166  
 <212> **PRT**  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

ES 2 813 936 T3

Met Ala Gln Thr Asn Ser Phe Phe Met Leu Ile Ser Ser Leu Met Phe  
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Ser Gln Gly Gln Glu Ser Gln Thr Glu Leu Pro Asn Pro  
 20 25 30

Arg Ile Ser Cys Pro Glu Gly Thr Asn Ala Tyr Arg Ser Tyr Cys Tyr  
 35 40 45

Tyr Phe Asn Glu Asp Pro Glu Thr Trp Val Asp Ala Asp Leu Tyr Cys  
 50 55 60

Gln Asn Met Asn Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu Thr Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Gly Ala Phe Val Ala Ser Leu Ile Lys Glu Ser Ser Thr Asp Asp Ser  
 85 90 95

Asn Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His  
 100 105 110

Trp Ser Ser Gly Ser Leu Val Ser Tyr Lys Ser Trp Asp Thr Gly Ser  
 115 120 125

Pro Ser Ser Ala Asn Ala Gly Tyr Cys Ala Ser Leu Thr Ser Cys Ser  
 130 135 140

Gly Phe Lys Lys Trp Lys Asp Glu Ser Cys Glu Lys Lys Phe Ser Phe  
 145 150 155 160

Val Cys Lys Phe Lys Asn  
 165

- 5 <210> 3  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética, cebador directo para PSP/reg 1 alfa
- 10 <400> 3  
 gaaaagacaa gaggcccaga cagagtt 27
- 15 <210> 4  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética, cebador de alargamiento para PSP/reg 1 alfa
- 20 <400> 4  
 gtatctctcg agaaaagaca agaggcccag a 31
- 25 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética, cebador inverso para PSP/reg 1 alfa

## ES 2 813 936 T3

<400> 5  
ctagtttttg aactgcata c 21

5 <210> 6  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
10 <223> Construcción sintética, cebador directo para PSP/reg 1 beta

<400> 6  
gaaaagacag gagtcccaga cagagctg 28

15 <210> 7  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Construcción sintética, cebador de alargamiento para PSP/reg 1 beta

<400> 7  
gtatctctcg agaaaagaca ggagtcccag ac 32

25 <210> 8  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Construcción sintética, cebador inverso para PSP/reg 1 beta

<400> 8  
atctgcagtc tagaattctg caggaccagt tctagac 37

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de diagnóstico *ex vivo* de peritonitis infecciosa en un ser humano, que comprende:
  - a) proporcionar una muestra de fluido corporal de dicho paciente, en el que dicha muestra de fluido corporal es una muestra de suero o una muestra de plasma;
  - 5 b) determinar el nivel de proteína de cálculos pancreáticos/proteína regeneradora (PSP/reg) en dicha muestra;
  - c) comparar el nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) con un valor de referencia, en donde el valor de referencia se obtiene determinando el nivel de PSP/reg en una muestra de fluido corporal de un paciente sin infección, y en donde el valor de referencia es por debajo de 20 ng/ml; yen donde un nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) de 30 ng/ml o más es indicativo de una peritonitis infecciosa.
- 10 2. Un método *ex vivo* para predecir la gravedad y el resultado de una peritonitis infecciosa en un ser humano, que comprende:
  - a) proporcionar una muestra de fluido corporal de dicho paciente, en donde dicha muestra de fluido corporal es una muestra de suero o una muestra de plasma;
  - b) determinar el nivel de proteína de cálculos pancreáticos/proteína regeneradora (PSP/reg) en dicha muestra;
  - 15 c) comparar el nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) con un valor de referencia, en donde el valor de referencia se obtiene determinando el nivel de PSP/reg en una muestra de fluido corporal de un paciente sin infección, y en donde el valor de referencia es por debajo de 20 ng/ml;en donde un nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) de 30 ng/ml o más es indicativo de una peritonitis infecciosa, y en donde dicho nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) es indicativo de la gravedad de dicha infección y predictivo del resultado, y en donde un nivel de PSP/reg igual o superior a 50 ng/ml es indicativo de insuficiencia orgánica simple o múltiple en un paciente, y en el que un nivel de PSP/reg igual o superior a 250 ng/ml es predictivo de mortalidad en un paciente
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha proteína PSP/reg tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha peritonitis infecciosa se selecciona del grupo de peritonitis primaria, secundaria o terciaria.
5. El método de la reivindicación 2, en donde un nivel de PSP/reg igual o superior a 400 ng/ml es predictivo de mortalidad en un paciente.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de PSP/reg en dicha muestra de fluido corporal se determina mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoensayo (EIA), espectrometría de masas o análisis de microarrays.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nivel de PSP/reg se determina mediante un ELISA sándwich, en donde las placas de microtitulación se recubren con un tipo de anticuerpo dirigido contra PSP/reg, las placas se bloquean y se carga la muestra o el estándar, se aplica un segundo tipo de anticuerpo contra PSP/reg, se añade un tercer anticuerpo que detecta el tipo particular del segundo anticuerpo conjugado con un marcador adecuado, y la marcador se usa para cuantificar la cantidad de PSP/reg.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador en el ELISA sandwich es una enzima para la detección cromogénica.

Fig. 1a

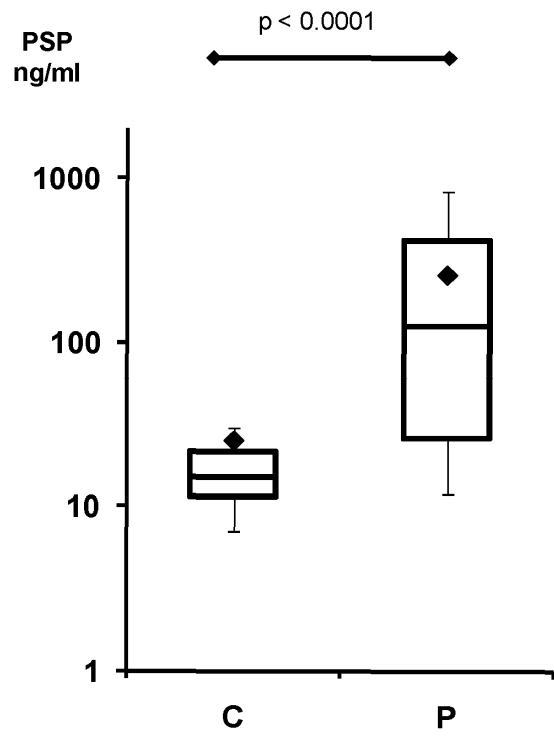




Fig. 1b

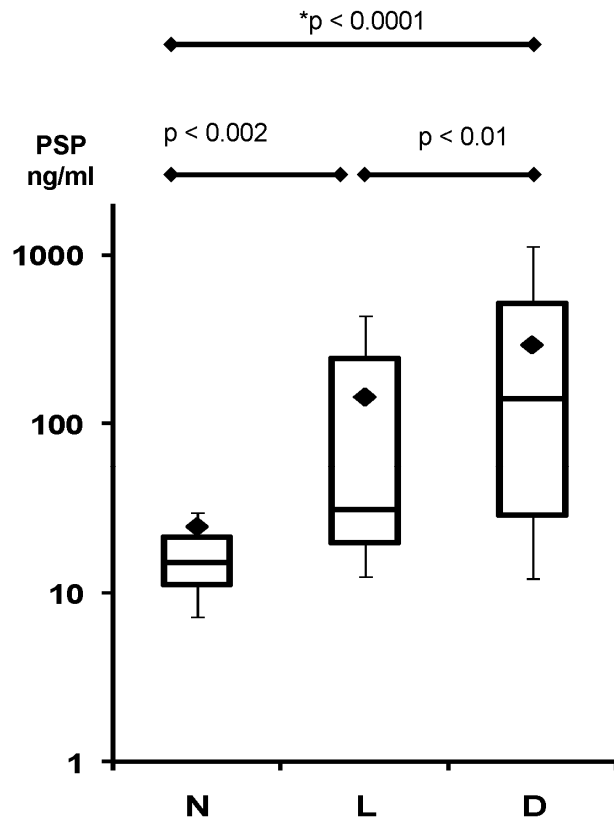


Fig. 1c

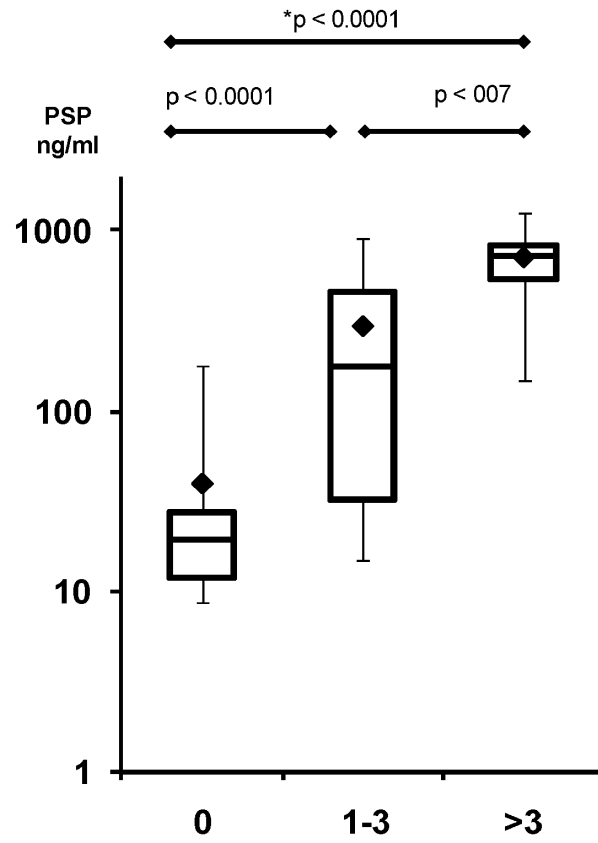


Fig. 1d

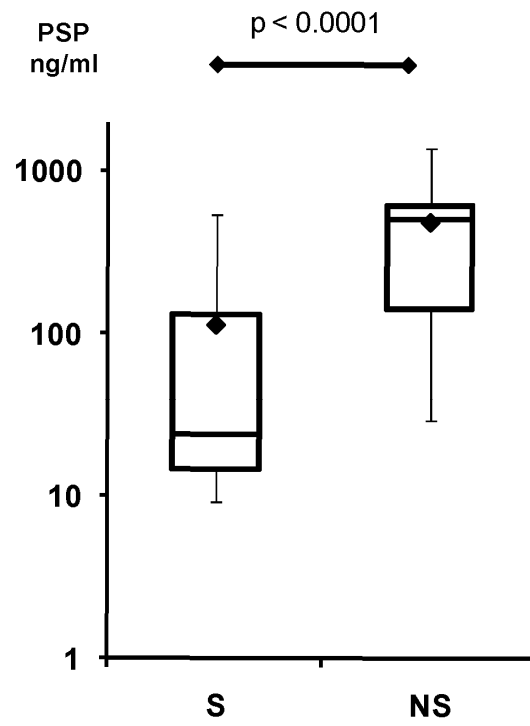


Fig. 2a

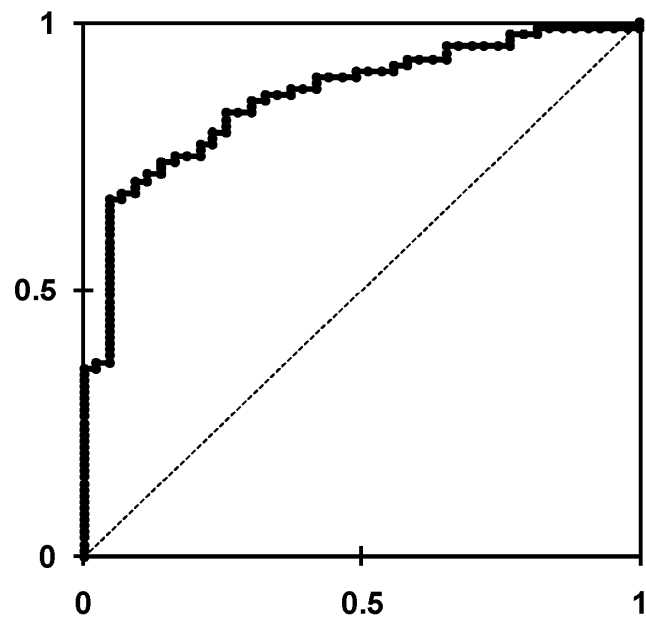


Fig. 2b

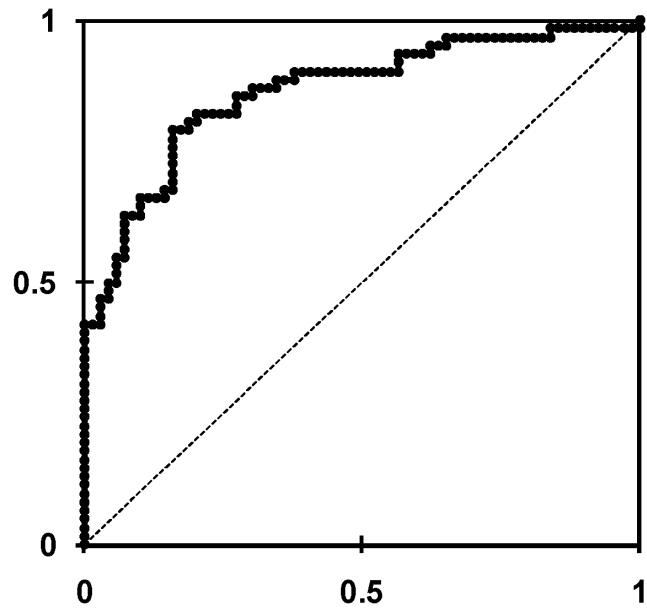


Fig. 2c

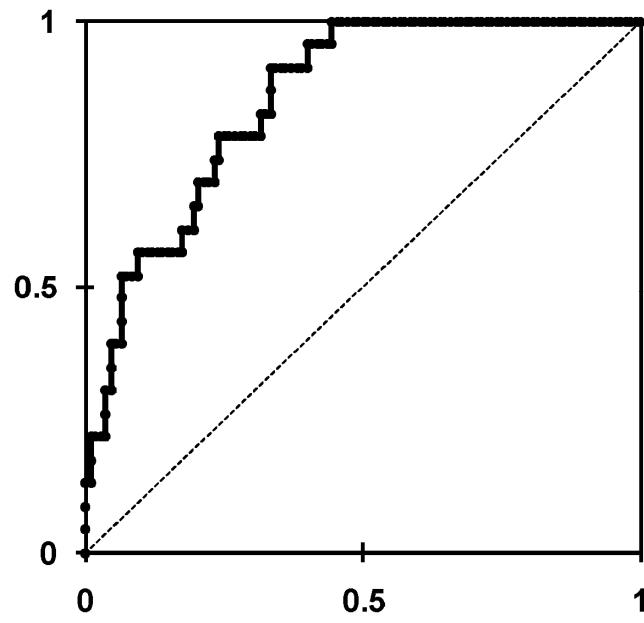


Fig. 3

