

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 788**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2016 PCT/GB2016/053269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017 WO17068347**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2016 E 16787529 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.09.2021 EP 3365462**

54 Título: **Detección de infección bacteriana**

30 Prioridad:

20.10.2015 GB 201518597

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

14.03.2022

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF LIVERPOOL (100.0%)
Foundation Building, 765 Brownlow Hill
Liverpool, Merseyside L69 7ZX, GB**

72 Inventor/es:

GRIFFITHS, MICHAEL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 899 788 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

Detección de infección bacteriana

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para detectar una infección bacteriana del torrente sanguíneo o del sistema nervioso central, tal como la meningitis bacteriana. La invención proporciona el uso médico de agentes antibacterianos en el tratamiento de una infección bacteriana del torrente sanguíneo o del sistema nervioso central, tal como la meningitis bacteriana, en un sujeto identificado como portador de dicha infección bacteriana por medio del uso de un método de la invención.

Introducción

15 La infección bacteriana constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad en el Reino Unido y en todo el mundo. La infección bacteriana puede implicar compartimentos corporales, tales como el cerebro, los pulmones y el intestino. La infección además puede implicar a todo el cuerpo.

20 La infección bacteriana del cerebro, conocida clínicamente como meningoencefalitis o meningitis (por la inflamación asociada al cerebro y/o las membranas [meninges] que lo recubren), es una infección catastrófica relacionada con altas velocidades de muerte o discapacidad. La meningitis bacteriana requiere un tratamiento de urgencia con antibióticos y otras terapias complementarias. Es una causa importante de morbilidad y mortalidad en el Reino Unido y en todo el mundo. Los costes económicos para la salud de la meningitis bacteriana son desproporcionadamente grandes porque muchos pacientes quedan con discapacidad neurológica; los costes para la sociedad de un solo caso pueden ser tan altos como 3-5 millones de libras esterlinas (datos de la Fundación para la Investigación de la Meningitis).

30 Actualmente, la meningitis es difícil de diagnosticar porque requiere una punción lumbar (LP), para obtener una muestra del líquido cefalorraquídeo (CSF) que rodea el cerebro. En muchos pacientes, la LP no se ejecuta cuando es necesario: en algunos, porque el paciente está muy grave, con convulsiones agudas o en coma; en otros, la LP se retrasa mientras se ejecutan los escáneres cerebrales o debido a la falta de personal capacitado. En consecuencia, los médicos pueden comenzar con antibióticos que después pueden resultar innecesarios, o retrasar el inicio de antibióticos hasta que se hayan hecho todas las investigaciones. Los retrasos en el diagnóstico o en el inicio de la terapia antimicrobiana pueden llevar a un peor resultado del paciente, que incluye un aumento de la mortalidad.

40 Los métodos actuales para detectar la meningitis bacteriana incluyen hemocultivos y punción lumbar. Los hemocultivos a menudo permanecen negativos durante un largo período de tiempo si la enfermedad es provocada por bacterias de crecimiento lento, de esta manera se retrasa un diagnóstico preciso y el comienzo de un antibiótico optimizado. Por otro lado, ejecutar una punción lumbar no es adecuado en todos los sujetos, por ejemplo, aquellos que han tomado recientemente medicamentos anticoagulantes. Además se asocia con un riesgo y una incomodidad innecesaria.

45 Adicionalmente, los sujetos sospechosos de tener la meningitis bacteriana típicamente reciben tratamiento antibiótico empírico, a pesar de la falta de resultados que confirmen la presencia de la meningitis bacteriana. Esto a menudo conduce a un tratamiento innecesario con antibióticos, lo que aumenta el coste del tratamiento y puede conducir al desarrollo de resistencia a los antibióticos.

50 Un estudio anterior de Lill y otros (2003) utiliza un método de detección de la meningitis bacteriana mediante el ensayo de una muestra de sangre para la expresión de un par de al menos dos genes para obtener datos indicativos de la abundancia relativa de determinadas moléculas objetivos. Adicionalmente, en la solicitud de patente WO 2015/155517, se describe un método para detectar una infección bacteriana (sepsis), que implica ensayar una muestra de sangre para determinar los niveles de expresión de genes particulares y determinar la presencia de una infección bacteriana (sepsis). Otro método para detectar una infección bacteriana (por ejemplo, una infección bacteriana del torrente sanguíneo y/o una infección con *S. aureus*) mediante el análisis de una muestra de sangre para determinar la expresión de al menos dos genes se dio a conocer en la solicitud de patente de EE.UU. 2014/0323391. Los inventores de la presente invención han demostrado que la relación del nivel de abundancia de expresión de pares de genes particulares proporciona suficiente sensibilidad y especificidad para diagnosticar infecciones bacterianas del torrente sanguíneo y del sistema nervioso central.

60 Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para detectar una infección bacteriana del torrente sanguíneo o del sistema nervioso central en un sujeto, el método comprende:

65

- ensayar una muestra de sangre representativa de la expresión génica en el sujeto para obtener datos indicativos de la relación de abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión del par de genes: ELANE e IFI44L, y opcionalmente al menos un par de genes adicional del grupo que consiste en: CTSG e IFI44L; ELANE y S1PR5; CTSG y S1PR5; GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IFI44L; APMAP y KMT2A; DUSP1 y HP1BP3; FLOT1 y NMT1; APMAP y HUWE1; ELANE y SIGLEC1; ELANE e IF127; y DUSP1 y NMT1;
- en donde las moléculas objetivos se seleccionan de: una molécula objetivo de ARNm que comprende un transcrito de ARN del gen relevante y una molécula objetivo de proteína que comprende una proteína codificada por el gen relevante; y
- determinar la presencia de una infección bacteriana del torrente sanguíneo o del sistema nervioso central en el sujeto en dependencia de los datos.

Adecuadamente, un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede comprender la obtención de datos indicativos de la relación de abundancia relativa de moléculas objetivos con respecto a cada uno de los pares de genes en el grupo que consiste de: ELANE e IFI44L; CTSG e IFI44L; ELANE y S1PR5; y CTSG y S1PR5; GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IFI44L; APMAP y KMT2A; DUSP1 y HP1BP3; APMAP y HUWE1; o DUSP1 y NMT1.

Adecuadamente, un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que se detecta una infección bacteriana en el sujeto, comprende además llevar a cabo un análisis de confirmación adicional de la infección bacteriana en el sujeto.

En una modalidad, la invención proporciona un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde la infección bacteriana del sistema nervioso central es provocada por las bacterias seleccionadas del grupo que consiste en: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*; *Streptococcus agalactiae*; *Listeria monocytogenes*; *Escherichia coli*; *Mycobacterium tuberculosis*; y *Staphylococcus aureus*.

En una modalidad, la invención proporciona un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde la molécula objetivo es una molécula objetivo de ARNm, y en donde el ensayo se selecciona del grupo que consiste en: RT-PCR, PCR en tiempo real, transferencia Northern, secuenciación de ARN (RNA-seq) y micromatriz de ARN.

En una modalidad, la invención proporciona un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde la molécula objetivo es una molécula objetivo de proteína y en donde el ensayo se selecciona del grupo que consiste en: ELISA, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, transferencia Western y espectrometría de masas.

En una modalidad del primer aspecto de la invención, se proporciona un método, en donde el sujeto tiene síntomas consistentes con una infección bacteriana tal como la meningitis bacteriana, o en donde el sujeto carece de algunos o todos los síntomas consistentes con una infección bacteriana tal como la meningitis bacteriana.

En una modalidad del primer aspecto de la invención en donde se cree que el sujeto tiene riesgo de desarrollar la meningitis bacteriana.

En una modalidad del primer aspecto de la invención, se proporciona un método en donde la etapa de determinación comprende usar los datos para calcular una o más funciones, donde se determina que la presencia de una infección bacteriana en el sujeto está presente, si una o más de las funciones calculadas satisfacen una condición predeterminada.

En una modalidad del primer aspecto de la invención, se proporciona un método en donde la una o más funciones incluyen una función lógica o una función lineal.

En una modalidad del primer aspecto de la invención, se proporciona un método, en donde la función lineal es una función discriminante lineal y, opcionalmente, en donde se satisface la condición predeterminada si la función discriminante lineal calculada excede un umbral predeterminado.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un agente antibacteriano para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana del sistema nervioso central en un sujeto identificado como portador de una infección bacteriana del sistema nervioso central mediante un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En una modalidad del segundo aspecto de la invención, la infección bacteriana es la meningitis bacteriana.

Materia sujeto descrita en la presente descripción

La materia sujeto descrita en la presente descripción no forma parte de la invención. Los términos "descripción" y "ejemplo" como se describen en la presente descripción se refieren a la información que puede ser útil en el contexto de la presente invención pero que no forman parte de la invención reivindicada.

En la presente descripción, se proporciona un método para detectar una infección bacteriana en un sujeto, el método comprende:

- 5 • ensayar una muestra representativa de la expresión génica en el sujeto para obtener datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos un par de genes del grupo que consiste en: ELANE e IF144L; CTSG e IF144L; ELANE y S1PR5; y CTSG y S1PR5; y
- determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos.

10 En otra descripción, un método puede comprender la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos con respecto a dos o más pares de genes de los enumerados. Por ejemplo, un método del primer aspecto de la invención puede comprender obtener datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos con respecto a tres o los pares de genes enumerados, o de los cuatro pares de genes enumerados. De hecho, modalidades del primer aspecto de la invención que obtienen datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos con respecto a los cuatro pares de genes: ELANE e IF144L; CTSG e IF144L; ELANE y S1PR5; y CTSG y S1PR5; y determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de dichos datos representan métodos particularmente útiles de la invención.

Otro ejemplo se refiere a un método para detectar una infección bacteriana en un sujeto, el método comprende:

- 20 • ensayar una muestra representativa de la expresión génica en el sujeto para obtener datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos un par de genes del grupo que consiste en: ELANE e IF144L; CTSG e IF144L; ELANE y S1PR5; CTSG y S1PR5; GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IF144L; APMAP y KMT2A; DUSP1 y HP1BP3; FLOT1 y NMT1; APMAP y HUWE1; ELANE y SIGLEC1; ELANE e IF127; y DUSP1 y NMT1; y
- 25 • determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos.

Además se describe en la presente descripción un ejemplo de un método para detectar una infección bacteriana de acuerdo con la invención, en el que se detecta una infección bacteriana en un sujeto, que puede comprender además una etapa de llevar a cabo un análisis de confirmación adicional para la infección bacteriana en el sujeto. Adecuadamente, en dicho ejemplo, se diagnostica una infección bacteriana cuando los resultados tanto del primer análisis (un método de la invención) como del segundo análisis (análisis de confirmación) indican la presencia de una infección bacteriana. Por ejemplo, puede cultivarse una muestra de líquido biológico, tal como CSF de una punción lumbar o sangre de una punción venosa, para hacer crecer el microorganismo asociado con la infección. Esto permite la confirmación de la infección bacteriana y además permite la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de cualquier patógeno aislado.

La descripción además proporciona un ejemplo de un método en el que se detecta una infección bacteriana en un sujeto, que puede comprender además una etapa de proporcionar al sujeto un tratamiento para la infección bacteriana.

De hecho, en otro ejemplo, se describe en la presente descripción un método para tratar una infección bacteriana en un sujeto, el método comprende:

- 45 • ensayar una muestra representativa de la expresión génica en el sujeto para obtener datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos un par de genes del grupo que consiste en: ELANE e IF144L; CTSG e IF144L; ELANE y S1PR5; y CTSG y S1PR5;
- determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos; y

50 proporcionar el tratamiento para una infección bacteriana al sujeto cuando la determinación indica la presencia de una infección bacteriana en el sujeto.

Además se describe en la presente descripción un método para tratar una infección bacteriana en un sujeto, el método comprende:

- 55 • ensayar una muestra representativa de la expresión génica en el sujeto para obtener datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos un par de genes del grupo que consiste en: ELANE e IF144L; CTSG e IF144L; ELANE y S1PR5; CTSG y S1PR5; GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IF144L; APMAP y KMT2A; DUSP1 y HP1BP3; FLOT1 y NMT1; APMAP y HUWE1; ELANE y SIGLEC1; ELANE e IF127; y DUSP1 y NMT1;
- 60 • determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos; y

proporcionar el tratamiento para una infección bacteriana al sujeto cuando la determinación indica la presencia de una infección bacteriana en el sujeto.

65

El tratamiento para una infección bacteriana, tal como la meningitis bacteriana, se proporciona en un método descrito en la presente descripción puede comprender proporcionar al sujeto que requiera dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antibacteriano.

5 Los métodos descritos en la presente descripción pueden comprender la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de pares de genes adicionales, siempre que esto sea adicional a la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de al menos uno de los pares de genes referidos en esta sección anteriormente.

10 En otra parte de la presente descripción se describen ejemplos adecuados de pares de genes adicionales y los beneficios que pueden obtenerse mediante el empleo de dichos pares adicionales.

15 Simplemente a manera de ejemplo, pares de genes adicionales particularmente adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente descripción pueden incluir al menos uno de: GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IFI44L; C20ORF3 y MLL; DUSP1 y HP1BP3; ELANE y SIGLEC1; o ELANE e IFI27.

Además se describe en la presente descripción un método para detectar la abundancia relativa de moléculas objetivos en un sujeto sospechoso de tener o desarrollar una infección bacteriana, el método comprende:

- 20
- Proporcionar una muestra representativa de la expresión génica en el sujeto sospechoso de tener o desarrollar una infección bacteriana;
 - Detectar la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos un par de genes, en donde par de genes se selecciona del grupo de acuerdo con los aspectos primero, segundo, 25 tercero o cuarto de la invención.

Los ejemplos descritos con respecto a un método además deben tomarse como aplicables a los otros métodos descritos en la presente descripción, a menos que sean incompatibles o se indique lo contrario.

30 Descripción detallada

Los métodos de la presente descripción proporcionan análisis sencillos que pueden usarse en el diagnóstico de infecciones bacterianas. Dichas infecciones incluyen, pero no se limitan a, la meningitis bacteriana. Las ventajas proporcionadas con respecto a la meningitis bacteriana son notables y merecen un comentario adicional en este momento.

35 Como se comenta en otra parte de la descripción, los métodos de la invención pueden ponerse en práctica en forma de análisis de sangre. El uso de una muestra de sangre para detectar infecciones bacterianas del cerebro, tales como la meningitis bacteriana, proporciona ventajas porque evita la necesidad de punciones lumbares más invasivas generalmente usadas en técnicas aceptadas en la técnica anterior para el diagnóstico de la meningitis bacteriana.

40 Como se describe en la presente descripción, puede cultivarse una muestra de líquido biológico, tal como CSF de una punción lumbar o sangre de una punción venosa, para hacer crecer el microorganismo asociado con la infección. Esto permite la confirmación de la infección bacteriana y además permite la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de cualquier patógeno aislado. La desventaja del cultivo es que típicamente se necesitan 48 horas o más para hacer crecer un microorganismo. Por el contrario, los métodos descritos en la presente descripción (por ejemplo, cuando se usan en una plataforma de PCR), pueden proporcionar una indicación de infección bacteriana 2-3 horas desde la recepción de la muestra, lo que permite el inicio rápido de antibióticos. Dado que los métodos de la descripción permiten el inicio rápido de antibióticos, la combinación adicional de etapas de confirmación opcionales no necesita retrasar indebidamente el tratamiento.

45 Los métodos de la invención, tales como los que emplean un análisis de sangre, pueden permitir identificar rápidamente a los pacientes con sospecha de la meningitis bacteriana y orientar al personal médico para que comience el tratamiento apropiado de inmediato. Además, dichos métodos permiten que los pacientes sin meningitis eviten antibióticos innecesarios y sean dados de alta del hospital más rápidamente.

50 Los pacientes con la meningitis bacteriana pueden presentar un intervalo de síntomas y signos clínicos, tales como dolor de cabeza, rigidez del cuello y disgusto por las luces brillantes (fotofobia). Sin embargo, algunos o todos estos síntomas pueden estar ausentes en sujetos individuales. Como se demuestra en los Resultados Experimentales, los métodos de la invención son capaces de distinguir la meningitis bacteriana probada de las condiciones 'parecidas', tal como el meningismo o la meningitis viral, que pueden dar lugar a síntomas que de cualquier otra manera podrían confundirse con los de la meningitis bacteriana.

55 Actualmente, la meningitis bacteriana se diagnostica mediante; (i) un número elevado de glóbulos blancos en el CSF y (ii) detección de bacterias (mediante cultivo bacteriano o un análisis de amplificación de ácido nucleico específico de bacterias [NAAT]). Los pacientes con meningismo a menudo tienen síntomas y signos clínicamente

indistinguibles de la meningitis bacteriana, pero las punciones lumbares llevadas a cabo en dichos sujetos demuestran que hay muy pocos glóbulos blancos en el CSF (<4 células/ μ l). Los pacientes con meningitis viral, nuevamente pueden tener síntomas y signos clínicamente indistinguibles de la meningitis bacteriana, pero estos casos las punciones lumbares detectan virus en el CSF (a través de NAAT viral específica).

5 Los métodos descritos en la presente descripción permiten la detección de infecciones bacterianas, tal como la meningitis bacteriana, incluso en los casos en los que la muestra se recolecta después de que el sujeto haya recibido antibióticos y/u otro tratamiento antimicrobiano. Esto contrasta con los métodos convencionales para detectar bacterias, ya sea por cultivo o por NAAT, que a menudo muestran poca sensibilidad (no detectan casos reales de infección bacteriana) cuando se recolectan muestras de pacientes después de que se ha iniciado el tratamiento antimicrobiano.

15 Las combinaciones de pares de genes de biomarcadores del hospedero usados en los métodos de la invención se han seleccionado deliberadamente mediante el uso de muestras de sangre de pacientes recolectadas tanto antes como después (hasta 6 semanas) del inicio del tratamiento antimicrobiano. Por tanto, la invención ofrece reducir el riesgo de pasar por alto casos reales de la meningitis bacteriana en los pacientes que han comenzado previamente un tratamiento con antibióticos.

20 Al medir los biomarcadores humanos en la sangre, esta invención ofrece revolucionar, acelerar y mejorar el diagnóstico de infecciones bacterianas, orientar la provisión rápida de un manejo apropiado de antibióticos y mejorar los resultados de los pacientes. Esto es especialmente beneficioso en el caso de infecciones bacterianas del CNS, tal como la meningitis bacteriana.

25 Con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, ciertos términos usados en la presente descripción se definirán ahora con más detalle en los párrafos siguientes.

Infección bacteriana

30 Una "infección bacteriana", para los propósitos de la presente descripción, puede tomarse como referencia a cualquier presencia y/o crecimiento no deseado de bacterias en un sujeto. Tal presencia no deseada de bacterias puede tener un efecto negativo sobre la salud y el bienestar del sujeto hospedero.

35 Si bien el término "infecciones bacterianas" no debe entenderse como que abarca el crecimiento y/o la presencia de bacterias que normalmente están presentes en el sujeto, por ejemplo en el tracto digestivo del sujeto, puede abarcar el sobrecrecimiento patológico de dichas bacterias.

Las infecciones bacterianas pueden provocarse por el crecimiento y/o la presencia de bacterias grampositivas y/o gramnegativas.

40 Las infecciones bacterianas pueden provocarse por un amplio intervalo de bacterias. Simplemente a manera de ejemplo, las bacterias que se asocian típicamente con la meningoencefalitis en seres humanos pueden incluir: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis*.

45 Otras bacterias implicadas en la infección humana del sistema nervioso central, particularmente cuando los sujetos tienen catéteres permanentes incluyen: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Ureaplasma urealyticum*.

50 Las bacterias implicadas en la infección humana fuera del sistema nervioso central incluyen: *Moraxella catarrhalis*, *Clostridium perfringens*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Legionella pneumophila*.

55 Los inventores creen que los métodos o usos médicos de la invención son aplicables a infecciones bacterianas (como se presenta en el primer o segundo aspecto de la invención) en las que los patógenos bacterianos se seleccionan de los grupos relevantes presentados anteriormente.

60 Los métodos o usos médicos descritos en la presente descripción son aplicables a la infección bacteriana en cualquier sistema, órgano o área del sujeto, tales como, pero no limitados a, el sistema gastrointestinal, el sistema respiratorio, el sistema urinario, el sistema ocular, el sistema auditivo y la piel. Los resultados además han demostrado que las infecciones bacterianas tales como sepsis (infección del torrente sanguíneo) y neumonía (infección bacteriana respiratoria) pueden detectarse mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción.

65 Se cree que los métodos y usos médicos descritos en la presente descripción tienen utilidad para ayudar a diagnosticar infecciones bacterianas de implantes protésicos. Estos pueden incluir implantes en la cabeza u otros

compartimentos corporales. Simplemente a manera de ejemplo adecuado de un implante de cabeza protésica, los Resultados Experimentales demuestran que los métodos de la descripción pueden distinguir correctamente la infección bacteriana de la falla mecánica en derivaciones ventriculoperitoneales (VP), mediante el uso de muestras de sangre o de CSF. Se prevé que los métodos descritos en la presente descripción funcionarían igualmente bien mediante el uso de líquido corporal de otros implantes, tal como CSF de drenajes ventriculares externos en la cabeza, o líquido sinovial del espacio articular alrededor de la prótesis de reemplazo de la rodilla.

Sin desmerecer lo anterior, los métodos y usos de la invención son particularmente adecuados para su uso en relación con infecciones bacterianas en el sistema nervioso central, tales como la meningitis bacteriana.

Meningitis bacteriana

El término "la meningitis bacteriana", como se usa en la presente descripción, se refiere a la inflamación de las meninges causada por cualquier especie de bacteria. Simplemente a manera de ejemplo, la meningitis bacteriana puede provocarse por bacterias seleccionadas del grupo que consiste en: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.

Como se ilustra por los resultados presentados en la sección de Resultados Experimentales, los métodos de la invención son capaces de distinguir entre la meningitis bacteriana y otros trastornos de las meninges, que incluyen meningismo y meningitis viral. Las referencias en la presente descripción a la detección o el diagnóstico de la meningitis bacteriana deben interpretarse en el sentido de que permiten que se hagan dichas distinciones, de acuerdo con la especificidad y selectividad de los métodos que se discuten con más detalle en la presente descripción.

Detectar infecciones bacterianas

Los métodos descritos en la presente descripción son métodos para detectar infecciones bacterianas en un sujeto. En el contexto de la presente descripción, el término "detectar" se considera que significa determinar la presencia de una infección bacteriana en un sujeto. Adecuadamente, y como se discute más abajo, los métodos de la invención pueden usarse para detectar la meningitis bacteriana.

A manera de ejemplo, el método de la descripción puede usarse para detectar una infección bacteriana que está asociada con síntomas en un sujeto. Alternativamente, los métodos de la descripción además pueden usarse para detectar una infección bacteriana que es esencialmente asintomática. Estas infecciones bacterianas asintomáticas pueden ser infecciones que se encuentran en una etapa muy temprana de la enfermedad.

Los inventores creen que la evaluación, en los métodos de la descripción, de la expresión de genes asociados con la respuesta del hospedero del sujeto a infecciones bacterianas para proporcionar información con respecto a la presencia de esta condición confiere ventajas notables. Sin desear estar ligado a ninguna hipótesis, una de dichas ventajas puede ser que las moléculas objetivos indicativas de la expresión de dichos genes se encuentran en niveles detectables en puntos temporales más tempranos que los marcadores potenciales expresados por las bacterias asociadas a la infección. Si bien los niveles de expresión de genes bacterianos pueden ser difíciles de detectar, especialmente durante las etapas tempranas de las infecciones bacterianas, la expresión de genes del hospedero puede evaluarse fácilmente. La mayor abundancia de dichas moléculas objetivos indicativas de la expresión de genes de respuesta del hospedero no solo permite que dichas evaluaciones se realicen en un momento más temprano, sino que además puede mejorar la precisión de la evaluación.

Detectar la meningitis bacteriana

Los métodos de la invención son métodos particularmente adecuados para su uso en la detección de la meningitis bacteriana en un sujeto.

Una vez que se ha detectado la meningitis bacteriana mediante un método de la invención, puede practicarse opcionalmente una etapa adicional para confirmar la detección. La etapa adicional puede comprender ejecutar un análisis de diagnóstico adicional para la meningitis bacteriana con respecto al sujeto. Dicho análisis de diagnóstico adicional puede usarse para identificar el patógeno bacteriano presente, o para proporcionar información con respecto a la susceptibilidad del patógeno bacteriano a los agentes antimicrobianos.

Los expertos en la técnica conocerán bien los ejemplos de dichos análisis de diagnósticos que pueden emplearse. Adecuadamente, el análisis de diagnóstico adicional puede comprender una punción lumbar. Las bacterias recolectadas como parte del análisis de diagnóstico adicional pueden investigarse mediante el cultivo o mediante NAAT como se describe en otra parte de la descripción.

Se apreciará que, incluso cuando se usa una punción lumbar para confirmar la detección o el diagnóstico que se proporciona por un método de la invención, el uso de los métodos de la invención reduce significativamente el

número de incidencias de punción lumbar que se necesitan (desde lumbar la punción puede evitarse en aquellos casos en los que los métodos de la invención indiquen que no hay la meningitis bacteriana).

Un sujeto

5 Los métodos y usos médicos se practican con respecto a un sujeto. El sujeto puede ser uno que requiera diagnóstico o tratamiento para una infección bacteriana, tal como la meningitis bacteriana. Adecuadamente, el sujeto puede ser un sujeto humano. El sujeto puede ser un paciente que recibe atención médica o un individuo que solicita atención médica.

10 En los métodos descritos en la presente descripción, un sujeto adecuado puede ser uno que se cree que tiene una infección bacteriana, como la meningitis bacteriana. Por ejemplo, un sujeto adecuado puede tener síntomas consistentes con una infección bacteriana, tal como la meningitis bacteriana. En dichos casos, los métodos de la descripción pueden ser del uso para detectar o diagnosticar definitivamente la presencia de una infección bacteriana, tal como la meningitis bacteriana. Alternativamente, un sujeto adecuado puede carecer de algunos o todos los síntomas consistentes con una infección bacteriana, tal como la meningitis bacteriana. Como se considera en otra parte en esta descripción, dicho sujeto puede ser sustancialmente asintomático.

15 Alternativamente, un sujeto adecuado en el contexto de la descripción, puede ser uno que se cree que está en riesgo de desarrollar una infección bacteriana, tal como la meningitis bacteriana. Dicho sujeto puede haber estado en contacto con un individuo que padece una infección bacteriana y, en consecuencia, puede creerse que tiene un riesgo elevado de desarrollar una infección bacteriana como resultado de este contacto.

20 La capacidad de los métodos de la descripción para detectar o diagnosticar una infección bacteriana, tal como la meningitis bacteriana, de manera oportuna y sin la necesidad de procedimientos invasivos como la punción lumbar, puede ser beneficiosa para cualquiera de los grupos de sujetos identificados anteriormente.

25 Se apreciará que un sujeto que puede beneficiarse de los métodos de la descripción es aquel en el que se determina que está presente una infección bacteriana mediante la evaluación y las comparaciones llevadas a cabo como parte de los métodos del primer, segundo o sexto aspectos de la invención.

Una muestra representativa de la expresión génica en un sujeto.

35 Los métodos de la invención hacen uso de muestras que son representativas de la expresión génica en el sujeto con respecto al cual se practica el método. En particular, los métodos descritos en la presente descripción usan muestras representativas de la expresión de genes de respuesta del hospedero que se implican en la respuesta de un sujeto a una infección bacteriana. Los métodos de la descripción pueden hacer uso de cualquier muestra que contenga moléculas objetivas que proporcionen una representación de dicha expresión génica en el sujeto en cuestión.

40 A manera de ejemplo, la muestra es una muestra de líquido corporal. Alternativamente, las muestras adecuadas pueden incluir muestras de tejido, tal como biopsias. En cualquier caso, una muestra adecuada (ya sea de un líquido corporal o de un tejido) puede comprender células biológicas del sujeto que se implican en la respuesta del hospedero a la infección bacteriana.

45 Una muestra de líquido corporal adecuada puede incluir: una muestra de sangre (por ejemplo, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma sanguíneo o una muestra de suero); o una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) o una muestra de líquido sinovial.

50 Las muestras de sangre son particularmente adecuadas para su uso en los métodos de la invención. El uso de una muestra de sangre (ya sea sangre completa, plasma o suero) es ventajoso, ya que es fácilmente accesible. Adicionalmente, la obtención de la muestra no se asocia con mucho menos riesgo e incomodidad para el paciente que en el caso de muestras tal como el CSF.

55 Las muestras pueden procesarse para el enriquecimiento de moléculas objetivas. Las técnicas adecuadas para tal enriquecimiento pueden determinarse con referencia a la naturaleza de la muestra y de la molécula objetivo en cuestión. Generalmente, los expertos en la técnica conocerán bien ejemplos de técnicas adecuadas (tales como técnicas para el aislamiento de células biológicas de una muestra y la preparación de las células para producir transcritos de genes).

60 Moléculas objetivas

65 Las moléculas objetivas adecuadas para su uso en el método de la descripción son cualquier molécula que sea representativa de la expresión génica en el sujeto. Dichas moléculas objetivas pueden ser representativas de la expresión génica directa o indirectamente. A manera de ejemplo, una molécula objetivo adecuada que sea directamente representativa de la expresión génica puede comprender un transcrito de ARN. Una molécula objetivo

adecuada que es indirectamente representativa de la expresión génica puede comprender una proteína codificada por el gen.

5 Se apreciará que la selección del tipo de molécula objetivo que se usa en un método de la invención debe considerarse en relación con la naturaleza de la muestra representativa de la expresión génica. En el caso de una muestra que contiene células hospederas, una molécula objetivo adecuada puede ser indicativa directa de la expresión génica (tal como un transcrito de ARN) o indirectamente indicativa de la expresión génica (tal como una proteína codificada por un gen expresado). En el caso de una muestra que es esencialmente acelular, puede preferirse el uso de moléculas objetivos que sean indicativas indirectamente de la expresión génica, ya que dichas moléculas objetivos (en particular, ejemplos de proteínas de dichas moléculas objetivos) pueden verse en la muestra, incluso en ausencia de células biológicas.

De la misma manera, la naturaleza de la molécula objetivo y, por lo tanto, la naturaleza de la muestra representativa de la expresión génica, puede elegirse para que sea consistente con su uso en un sistema de ensayo preferido.

15 Ensayo

20 Cuando se practica el método de la descripción, se ensaya la muestra para determinar la abundancia relativa de las moléculas objetivos de interés. Generalmente, el experto en la técnica conocerá técnicas adecuadas para ensayar la expresión génica con el fin de proporcionar información con respecto a la abundancia relativa. Como se presentó anteriormente, puede elegirse una técnica de ensayo adecuada con referencia a la naturaleza de la muestra y las moléculas objetivos.

25 Simplemente a manera de ejemplo, la expresión génica puede medirse directamente mediante técnicas que permiten la detección y cuantificación de moléculas objetivos de ARN, tales como RT-PCR, PCR en tiempo real, transferencia Northern, secuenciación de ARN (RNA-seq) y micromatriz de ARN.

30 La expresión génica puede medirse indirectamente, mediante técnicas que permiten la detección y cuantificación de moléculas objetivos de proteínas, tales como ELISA, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, transferencia Western y espectrometría de masas. El experto en la técnica puede conocer otras técnicas adecuadas para ensayar proteínas.

35 Además se describe en la presente descripción, un ensayo que puede permitir que se determine la abundancia relativa de múltiples conjuntos de moléculas objetivos dentro de una única reacción. Un ensayo que cumpla dichos requisitos puede referirse como un ensayo múltiple. Adecuadamente, un ensayo múltiple puede permitir que se determine la abundancia relativa de todas las moléculas objetivos requeridas dentro de una única mezcla de reacción (un ensayo múltiple de "tubo único"). Los ensayos múltiples de un solo tubo pueden ser particularmente adecuados para determinar la abundancia relativa de moléculas objetivos de transcritos de ARNm dentro de una muestra.

40 Datos indicativos de abundancia relativa de moléculas objetivos

45 Los métodos descritos en la presente descripción implican la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos relevantes. Para los propósitos de la presente invención, puede considerarse que dichos "datos indicativos de abundancia relativa" abarcan cualquier dato que pueda usarse para determinar la presencia de una infección bacteriana, tal como la meningitis bacteriana, en un sujeto. En una descripción adecuada, los datos proporcionan una indicación cuantitativa de la abundancia relativa de expresión de miembros de pares de genes, por ejemplo, con referencia a moléculas objetivos relevantes.

50 Los genes y los pares de genes adecuados para su uso en los métodos de la invención.

Los métodos descritos en la presente descripción implican la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos uno de los pares de genes referidos en la descripción. Estos pares de genes se forman de los genes de respuesta del primer y segundo hospedero.

55 La lista de genes a partir de los cuales se componen los pares de genes a los que se hace referencia en la presente descripción se presenta en la Tabla 1, que además proporciona detalles de los productos codificados por estos genes. Los grupos particulares de pares de genes de interés que pueden emplearse útilmente en los métodos se presentan en las Tablas 2 a 5.

60 La expresión de los genes y los pares de genes se investiga mediante el ensayo de la muestra en busca de moléculas objetivos indicativas de la expresión de dichos genes de respuesta del hospedero, como se refirió anteriormente.

65

Tabla 2

Los métodos descritos en la presente descripción implican la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos un par de genes del grupo que consiste en: ELANE e IF144L; CTSG e IF144L; ELANE y S1PR5; y CTSG y S1PR5. Este grupo de pares de genes se presenta en la Tabla 2.

5 Un método de la descripción puede implicar la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos dos, o al menos tres de los pares de genes presentados en la Tabla 2, y determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a cada par para el que se obtienen datos. Adecuadamente, un método de la descripción puede implicar la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de los cuatro pares de genes presentados en la Tabla 2, y la determinación de la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a los cuatro de estos pares.

Tabla 3

15 Con fines ilustrativos, un método de la descripción implica la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o trece. pares de genes seleccionados del grupo que consiste en: ELANE e IF144L; CTSG e IF144L; ELANE y S1PR5; CTSG y S1PR5; GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IF144L; APMAP y KMT2A; DUSP1 y HP1BP3; , FLOT1 y NMT1, APMAP y HUWE1, ELANE y SIGLEC1; ELANE e IF127; y DUSP1 y NMT1. Este grupo de pares de genes se presenta en la Tabla 3.

25 Adecuadamente, un método descrito en la presente descripción puede implicar la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, o al menos doce de los pares de genes presentados en la Tabla 3, y determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a cada par para el que se obtienen datos.

30 Un método descrito en la presente descripción implica la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis, hasta siete, hasta ocho, hasta nueve, hasta diez, hasta once o hasta doce de los pares de genes presentados en la Tabla 3, y determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a cada par para el que se obtienen los datos.

35 En un ejemplo adecuado, un método de la descripción puede implicar la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de los trece pares de genes presentados en la Tabla 3, y la determinación de la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a los trece de estos pares de genes.

Tabla 4

45 En un ejemplo adicional, el método de la descripción implica obtener datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis pares de genes seleccionados del grupo que consiste en: GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IF144L; APMAP y KMT2A; DUSP1 y HP1BP3; APMAP y HUWE1; y DUSP1 y NMT1. Este grupo de pares de genes se presenta en la Tabla 4.

50 Adecuadamente, un método descrito en la presente descripción puede implicar la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco de los pares de genes presentados en Tabla 4, y determinación de la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a cada par para el que se obtienen los datos.

55 En un ejemplo adecuado, un método de la descripción implica la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de dos, hasta tres, hasta cuatro o hasta cinco de los pares de genes presentados en la Tabla 4, y determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a cada par para el que se obtienen datos.

60 En un ejemplo adecuado, un método de la descripción puede implicar la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de los seis pares de genes presentados en la Tabla 4, y la determinación de la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a los seis pares de genes.

65

Tabla 5

- 5 En un ejemplo adecuado, el método de la descripción implica la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez pares de genes seleccionados. del grupo que consiste en: ELANE e IFI44L; CTSG e IFI44L; ELANE y S1PR5; CTSG y S1PR5; GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IFI44L; APMAP y KMT2A; DUSP1 y HP1BP3, ELANE y SIGLEC1; y ELANE e IFI27. Este grupo de pares de genes se presenta en la Tabla 5.
- 10 Adecuadamente, un método de la descripción puede implicar la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, o al menos nueve de los pares de genes presentados en la Tabla 5, y determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a cada par para el que se obtienen los datos.
- 15 En un ejemplo adecuado, un método de la descripción implica la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis, hasta siete, hasta ocho, o hasta nueve de los pares de genes presentados en la Tabla 5, y determinar la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a cada par para el que se obtienen los datos.
- 20 En un ejemplo adecuado, un método de la descripción puede implicar la obtención de datos indicativos de la abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión de los diez pares de genes presentados en la Tabla 5, y la determinación de la presencia de una infección bacteriana en el sujeto en dependencia de los datos con respecto a los diez de estos pares de genes.
- 25 En un ejemplo adecuado, un método de la descripción puede basarse en el uso de datos solo con respecto a los genes, o los pares de genes, presentados en los párrafos precedentes. Por ejemplo, un método de la invención puede hacer uso únicamente de datos con respecto al conjunto de pares de genes presentados en la Tabla 2. Adecuadamente, un método de la descripción puede hacer uso solo de datos con respecto al conjunto de pares de genes presentados en la Tabla 3. En un ejemplo adecuado, un método de la descripción puede hacer uso solo de datos con respecto al conjunto de pares de genes presentados en la Tabla 4. Alternativamente, un método de descripción puede hacer uso solo de datos con respecto al conjunto de pares de genes presentados en la Tabla 5.
- 30 En otro ejemplo adecuado, los métodos de la descripción pueden emplear uno o más pares de genes adicionales a los presentados en la Tabla 3.
- 35 Determinar la presencia de una infección bacteriana.
- 40 Adecuadamente, en un método de la invención, la etapa de determinación comprende usar los datos para calcular una o más funciones, donde se determina que la presencia de una infección bacteriana en el sujeto está presente si una o más de las funciones calculadas satisface una condición predeterminada.
- 45 En una modalidad adecuada, la una o más funciones incluyen una función lógica. En otra modalidad adecuada, la una o más funciones incluyen una función lineal. En los resultados experimentales más abajo se presentan ejemplos de dichas modalidades.
- 50 Adecuadamente, la función es una función discriminante lineal. Un ejemplo de una función discriminante lineal adecuada que puede emplearse en los métodos de la invención se describe en la sección de Resultados Experimentales.
- Adecuadamente, la condición predeterminada se satisface si la función discriminante lineal calculada excede un umbral predeterminado. En la sección Resultados Experimentales se describe un ejemplo de un umbral predeterminado adecuado que puede emplearse con referencia a una función discriminante lineal.
- 55 Tratamiento de infecciones bacterianas, tal como la meningitis bacteriana.
- La presente descripción considera el tratamiento de infecciones bacterianas, tales como la meningitis bacteriana, no solo en los métodos de tratamiento y usos médicos descritos en la presente descripción, sino además en ciertas modalidades de los métodos de detección o diagnóstico de la meningitis bacteriana.
- 60 El tratamiento de infecciones bacterianas, tales como la meningitis bacteriana, en el contexto de la presente descripción generalmente implicará el suministro de agentes antibacterianos a un sujeto que requiera dicho tratamiento. Los agentes antibacterianos adecuados incluyen antibióticos tales como los seleccionados del grupo que consiste en: Cefalosporinas de tercera generación (por ejemplo, ceftriaxona, cefotaxima), ampicilina, penicilina G, meropenem, fluoroquinolona, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol.
- 65 Adecuadamente, puede seleccionarse un agente antibacteriano para usar de acuerdo con este aspecto de la invención con referencia a la naturaleza de las bacterias que dan lugar a la meningitis bacteriana, a tratar.

Con fines ilustrativos, en el caso de una infección bacteriana con *Streptococcus pneumoniae* un agente antibacteriano para su uso de acuerdo con este aspecto de la invención puede seleccionarse del grupo de: vancomicina más una cefalosporina de tercera generación; ceftriaxona o cefotaxima; Meropenem (C-III), fluoroquinolonec (B-II).

Así, en el caso de una infección bacteriana con *Neisseria meningitidis* un agente antibacteriano para su uso de acuerdo con este aspecto de la descripción puede seleccionarse del grupo de: una cefalosporina de tercera generación; Ceftriaxona; Penicilina G, ampicilina, cloranfenicol, fluoroquinolona, aztreonam.

Así, en el caso de una infección bacteriana con *Listeria monocytogenes* un agente antibacteriano para su uso de acuerdo con este aspecto de la descripción puede seleccionarse del grupo de: Ampicilina (opcionalmente con la adición de un aminoglucósido) o penicilina G (opcionalmente con la adición de un aminoglucósido) Trimetoprim-sulfametoxazol, meropenem (B-III).

Así, en el caso de una infección bacteriana con *Streptococcus agalactiae* un agente antibacteriano para su uso de acuerdo con este aspecto de la descripción puede seleccionarse del grupo de: Ampicilina o penicilina G (opcionalmente con adición de un aminoglucósido) Cefalosporinas de tercera generación (B-III).

Así, en el caso de una infección bacteriana con *Haemophilus influenzae* un agente antibacteriano para su uso de acuerdo con este aspecto de la descripción puede seleccionarse del grupo de: Cefalosporina de tercera generación, ceftriaxona; (A-I) Cloranfenicol, cefepime (A-I), meropenem (A-I), fluoroquinolona.

Así, en el caso de una infección bacteriana con *Escherichia coli* un agente antibacteriano para su uso de acuerdo con este aspecto de la descripción puede seleccionarse del grupo de: Cefalosporina de tercera generación, ceftriaxona, (A-II) Cefepime, meropenem, aztreonam, fluoroquinolona, trimetoprim-sulfametoxazol.

La invención se describirá ahora con referencia a los Resultados Experimentales y las Figuras acompañantes, en los que:

La Figura 1 es un gráfico de dispersión de la relación de abundancia relativa general (formulada mediante la regla discriminante) para el análisis de respuesta del hospedero de 4 transcritos entre la meningitis bacteriana comprobada en comparación con otras (meningismo o meningitis viral [n=10 por grupo]).

Eje X - grupos de pacientes. La abundancia de transcritos en sangre completa se midió por duplicado en cada paciente mediante qPCR.

Eje Y - índice de abundancia relativa general. Unidades nominales. Se exhiben la mediana y el intervalo intercuartil.

La Figura 2 es una curva de operador receptor (ROC) para el análisis de respuesta del hospedero de 4 transcritos, medida mediante qPCR, mediante el uso de pacientes con la meningitis bacteriana comprobada (n=10) en comparación con otros (meningismo o meningitis viral [n=20]). Esto se basa en datos de la Figura 1.

La Figura 3 es un gráfico de dispersión de la relación de abundancia relativa general (formulada mediante regla discriminante) para el análisis de respuesta del hospedero de 4 transcritos entre la meningitis bacteriana comprobada (n=13) en comparación con otras (meningismo o meningitis viral [n=88]).

Eje X - grupos de pacientes. La abundancia de transcritos en sangre completa se midió mediante qPCR en un conjunto de muestras independientes (n=101).

Eje Y - relación de abundancia relativa general (formulado mediante la regla discriminante). Unidades nominales. Se exhiben la mediana y el intervalo intercuartil.

Nota: Se usó una baja proporción de pacientes con la meningitis bacteriana (13 % [13/101]) en el conjunto de muestra para reflejar la prevalencia de la meningitis bacteriana observada entre adultos con sospecha de meningitis en el Reino Unido.

La Figura 4 es una curva de operador receptor (ROC) para el análisis de respuesta del hospedero de 4 transcritos, medida mediante qPCR, mediante el uso de pacientes con la meningitis bacteriana comprobada (n=13) en comparación con otros (meningismo o meningitis viral [n=88]). Esto se basa en datos de la Figura 3.

La Figura 5 es un gráfico de dispersión de la puntuación acumulada para el análisis de respuesta del hospedero de 12 transcritos. Abundancia de transcritos medida mediante qPCR, mediante el uso de pacientes con la meningitis bacteriana comprobada (n=10) en comparación con otros (meningismo o meningitis viral [n=71]). Se usaron abundancias de relación relativa de pares de marcadores (n=10) para proporcionar una puntuación acumulada.

La Figura 6 muestra una curva de operador de receptor (ROC) para el análisis de respuesta del hospedero de 12 transcritos. Abundancia de transcritos medida mediante qPCR, mediante el uso de pacientes con la meningitis bacteriana comprobada (n=10) en comparación con otros (meningismo o meningitis viral [n=71]). La ROC se basa en datos de la Figura 5.

La Figura 7 es un gráfico de dispersión de la relación de abundancia relativa (formulada mediante una regla discriminante) para el análisis de respuesta del hospedero de 4 transcritos entre la meningitis bacteriana comprobada y la infección de la derivación ventriculoperitoneal (VP) comprobada. El gráfico muestra los resultados de la meningitis bacteriana comprobada (n=10) en comparación con otras (meningismo o meningitis viral [n=20]). Además, el gráfico muestra los resultados de la sangre de un paciente con infección bacteriana de la derivación ventriculoperitoneal (VP) confirmada (n=1); sangre de un paciente con derivación VP bloqueada mecánicamente confirmada (n=1) con una muestra adicional de ARN extraída del CSF del mismo paciente.

Eje X - grupos de pacientes. La abundancia de transcritos en sangre completa se midió mediante qPCR en un conjunto de muestras independientes (n=101).

Eje Y - relación de abundancia relativa general (formulado mediante la regla discriminante). Unidades nominales. Se exhiben la mediana y el intervalo intercuartil.

Resultados experimentales

1. Métodos

1.1 Selección de pacientes

El ensayo de respuesta de la sangre del hospedero distingue la infección por CSF bacteriana confirmada (cultivo positivo o PCR específica de patógeno en CSF; o pleocitosis de CSF y cultivo positivo o PCR específica de patógeno en sangre) de condiciones similares; específicamente, meningismo o meningitis viral (pacientes con signos y síntomas de infección pero CSF estéril; o PCR viral específica en CSF).

Los marcadores discriminatorios para la meningitis bacteriana comprobada se identificaron inicialmente mediante análisis transcriptómico del genoma completo mediante el uso de muestras de sangre de pacientes adultos con sospecha de meningitis (n=30) reclutados a través de hospitales del Reino Unido.

Luego, estos marcadores se volvieron a evaluar mediante el uso de metadatos de abundancia de transcritos compilados de estudios de micromatrices previos entre pacientes niños y adultos con la meningitis bacteriana comprobada, meningismo, meningitis viral, encefalitis de poblaciones del Reino Unido, Nepal, India, Malawi y Vietnam con y sin coinfección de HIV (n=180). Los marcadores que distinguieron la meningitis bacteriana de otras, después se analizaron mediante el uso de una plataforma de PCR cuantitativa (qPCR) que reusaron muestras de pacientes (n=30). Los marcadores que permanecen altamente discriminatorios para la meningitis bacteriana se validaron después en un conjunto independiente de pacientes adultos del Reino Unido (n=101) con sospecha de meningitis mediante qPCR.

1.2 Recogida de muestras

Se recogieron muestras de sangre completa venosa (2,5 ml) en tubos estabilizadores de ARN (Paxgene) durante el ingreso hospitalario agudo (antes o después de comenzar el tratamiento con antibióticos) en sujetos que dieron su consentimiento.

1.3 Extracción de ARN

El ARN total se extrajo mediante el uso de kits de extracción de ARN en sangre (Paxgene) que siguen las instrucciones de los fabricantes.

1.4 Micromatrices de expresión génica

El ARN total (500 ng por muestra) se amplificó y etiquetó mediante el uso de Low Input Quick Amp. Kits de etiquetado (Agilent). El ARN amplificado se obtiene de la muestra del paciente y se marcó con cianina 3. El ARN amplificado humano de control (Universal RNA) se marcó con cianina 5. El ARN marcado (200 ng) se hibridó con micromatrices específicos para humanos SurePrint G3 GE 8x60K (Design ID 030495) que sigue las instrucciones de los fabricantes (Agilent Technologies). Las matrices se escanearon mediante el uso de escáner Agilent G2505C (Agilent Technologies). Se midió la intensidad de la fluorescencia sin procesar y se realizó la evaluación inicial del control de calidad mediante el uso del software Agilent Feature Extraction (FE 10.5.1.1). Los datos de los transcritos se procesaron como se describió anteriormente. Los transcritos que exhiben una diferencia estadísticamente significativa en la abundancia relativa de transcritos entre los casos de la meningitis bacteriana comprobados y otros casos se identificaron en función del cambio de veces y la velocidad de detección falsa (FDR) de SAM 4.0. (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>).

1.5 PCR cuantitativa

Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total (500 ng por muestra) mediante el uso del kit Retroscript II (Ambion). La PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo con 50 ng de ADN de ARN amplificado mediante el uso de ensayos de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems) en un sistema de qPCR en tiempo real BioRad

y se siguen las instrucciones de configuración del termociclador y el ensayo del fabricante. Se realizaron ensayos simples individuales (es decir, un ensayo por biomarcador por pocillo). La abundancia relativa de transcritos objetivo entre los marcadores se cuantificó mediante el uso del método $\delta\delta$ CT.

5 1.6 Análisis de abundancia relativa de transcritos

La abundancia relativa de transcritos para un conjunto de 4 genes discriminatorios (Tabla 2) en los datos de micromatrices se usó para construir una función discriminante lineal entre bacterias probadas (n=10) y otras (n=20). La regla discriminante resultante predijo bacterias, si $D > 1,18$, donde $D = 1,653 \cdot \log(\text{gen A}) - 57,317 \cdot \log(\text{gen B}) - 0,577 \cdot \log(\text{gen C}) + 44,711 \cdot \log(\text{gen D})$ (Figura 1). Estos genes fueron luego validados mediante el uso de qPCR en los últimos conjuntos de muestras de pacientes (Figuras 3 y 4).

Por medio del ejemplo adicional, además puede llegarse a la identificación de la muestra como indicativa de la meningitis bacteriana mediante abundancias relativas de marcadores de transcripción mediante el uso de diferentes ecuaciones (que pueden incluir operandos lógicos). Un ejemplo de tal ecuación es el siguiente:

$$1 \text{ [la meningitis bacteriana]} = \text{SI}(\text{Y}(\text{Gene A} > \text{Gene B} \cdot 1.21, \text{Gene C} > \text{Gene D} \cdot 0.89, \text{Gene B} > \text{Gene C} \cdot 0.97), 1, 0)$$

$$D = (1.03 \cdot \log(1/\text{Gene A} + \text{Gene B}) / (1/\text{Gene C} + \text{Gene D}))$$

Mediante el uso de marcadores discriminatorios adicionales identificados durante el análisis de metadatos (Tabla 6), el conjunto de marcadores se optimizó mediante el uso de combinaciones de 11 transcritos adicionales (Tabla 3). En estos conjuntos de marcadores, se usó la relación de abundancia relativa de pares de marcadores (hasta 13 pares) para proporcionar una puntuación acumulada. Un análisis adicional de los resultados obtenidos mediante el uso de los genes presentados en la Tabla 3 mostró que los marcadores se podían eliminar para producir dos conjuntos de marcadores refinados sin una caída significativa en el rendimiento del conjunto de marcadores (Tabla 4 y Tabla 5). Todos estos conjuntos de marcadores mostraron una sensibilidad mejorada en comparación con el grupo presentados en la Tabla 2.

30 2 Resultados

El análisis de la respuesta del hospedero de 4 transcritos medida a través de qPCR entre 30 muestras de pacientes (muestras reusadas del estudio de micromatrices original) exhibió una sensibilidad del 100 % (10/10), una especificidad del 95 % (19/20) y una precisión del 97 % (29/30).

35 El análisis de la respuesta del hospedero de 4 transcritos (Tabla 2) medida a través de qPCR entre 101 muestras de pacientes (conjunto de muestras independientes de estudios de micromatrices) exhibió una sensibilidad del 85 % (11/13), una especificidad del 74 % (65/88) y una precisión del 75 % (76/101).

40 El análisis de la respuesta del hospedero de 15 transcritos (Tabla 3) medida a través de qPCR entre 81 muestras de pacientes (conjunto de muestras independientes de estudios de micromatrices) exhibió una sensibilidad del 100 % (10/10), una especificidad del 72 % (51/71) y una precisión del 75 % (61/81)

El conjunto de respuestas del hospedero de 9 transcritos (Tabla 4) medidas mediante qPCR entre 102 muestras de pacientes (conjunto de muestras independientes de estudios de micromatrices) exhibió una sensibilidad del 91 % (10/11), una especificidad del 74 % (68/91) y una precisión del 76 % (78/102).

45 El análisis de la respuesta del hospedero de 12 transcritos (Tabla 5) medida a través de qPCR entre 81 muestras de pacientes (conjunto de muestras independientes de estudios de micromatrices) exhibió una sensibilidad del 100 % (10/10), una especificidad del 72 % (51/71) y una precisión del 75 % (61/81) - Figura 5.

50 Tablas de genes

Tabla 1

Gen	Codifica
ELANE	elastasa de neutrófilos
IFI44L	Similar a la proteína 44 inducida por interferón
CTSG	Catepsina G
S1PR5	receptor 5 de esfingosina-1-fosfato
GRK6	receptor de quinasa 6 acoplado a proteínas G
TXLNA	taxilina alfa
DUSP1	fosfatasa 1 de especificidad dual

Gen	Codifica
APMAP (anteriormente C20orf3)	proteína asociada a la membrana plasmática de adipocitos
KMT2A	metiltransferasa 2A específica de lisina (K)
HP1BP3	proteína heterocromatina 1, proteína de unión 3
SIGLEC1	lectina 1 similar a Ig que se une al ácido siálico, sialoadhesina
IFI27	proteína 27 inducible por interferón alfa
NMT1	N-miristoiltransferasa 1
FLOT1	flotilina 1
HUWE1	Dominio HECT, UBA y WWE que contiene 1, proteína ligasa de ubiquitina E3

Tabla 2

Primer gen	Segundo gen
ELANE	IFI44L
CTSG	IFI44L
ELANE	S1PR5
CTSG	S1PR5

Tabla 3

Primer gen	Segundo gen
ELANE	IFI44L
CTSG	IFI44L
ELANE	S1PR5
CTSG	S1PR5
GRK6	TXLNA
DUSP1	IFI44L
APMAP	KMT2A
DUSP1	HP1BP3
FLOT1	NMT1
APMAP	HUWE1
ELANE	SIGLEC1
ELANE	IFI27
DUSP1	NMT1

Tabla 4

Primer gen	Segundo gen
GRK6	TXLNA
DUSP1	IFI44L
APMAP	KMT2A
DUSP1	HP1BP3
APMAP	HUWE1
DUSP1	NMT1

Tabla 5

Primer gen	Segundo gen
ELANE	IFI44L
CTSG	IFI44L
ELANE	S1PR5
CTSG	S1PR5
GRK6	TXLNA
DUSP1	IFI44L
APMAP	KMT2A
DUSP1	HP1BP3
ELANE	SIGLEC1
ELANE	IFI27

Tabla 6

GRK6	TXLNA	DUSP1	APMAP	KMT2A
HP1BP3	FLOT1	NMT1	HUWE1	SIGLEC1
IFI27	ITGA4	METTL9	DHRS7	LRPAP1
DEFA8P	LIPN	HP	HLA-DPA1	JUNB
SF1	IRS2	TUBA4A	IFIT2	ATM
MEF2A	IMPA2	BIN1	PLP2	MADD
TRIM26	CNPY3	RAF1	RHOG	PRKCD

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar una infección bacteriana del torrente sanguíneo o del sistema nervioso central en un sujeto, el método comprende:
- 10 • ensayar una muestra de sangre representativa de la expresión génica en el sujeto para obtener datos indicativos de la relación de abundancia relativa de moléculas objetivos indicativas de la expresión del par de genes: ELANE e IFI44L, y opcionalmente al menos un par de genes adicional del grupo que consiste en: CTSG e IFI44L; ELANE y S1PR5; CTSG y S1PR5; GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IFI44L; APMAP y KMT2A; DUSP1 y HP1BP3; FLOT1 y NMT1; APMAP y HUWE1; ELANE y SIGLEC1; ELANE e IF127; y DUSP1 y NMT1;
- 15 • en donde las moléculas objetivos se seleccionan de: una molécula objetivo de ARNm que comprende un transcrito de ARN del gen relevante y una molécula de proteína objetivo que comprende una proteína codificada por el gen relevante; y
- determinar la presencia de una infección bacteriana del torrente sanguíneo o del sistema nervioso central en el sujeto en dependencia de los datos.
- 20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende obtener datos indicativos de la relación de abundancia relativa de moléculas objetivos con respecto a cada uno de los pares de genes en el grupo que consiste en ELANE e IFI44L; CTSG e IFI44L; ELANE y S1PR5; y CTSG y S1PR5; GRK6 y TXLNA; DUSP1 e IFI44L; APMAP y KMT2A; DUSP1 y HP1BP3; APMAP y HUWE1; o DUSP1 y NMT1.
- 25 3. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que se detecta una infección bacteriana en el sujeto, que comprende además llevar a cabo un análisis de confirmación adicional para la infección bacteriana en el sujeto.
- 30 4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la infección bacteriana del sistema nervioso central es provocada por bacterias seleccionadas del grupo que consiste en: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*; *Streptococcus agalactiae*; *Listeria monocytogenes*; *Escherichia coli*; *Mycobacterium tuberculosis*; y *Staphylococcus aureus*.
- 35 5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la molécula objetivo es una molécula objetivo de ARNm y en donde el ensayo se selecciona del grupo que consiste en: RT-PCR, PCR en tiempo real, transferencia Northern, secuenciación de ARN (RNA-seq) y micromatriz de ARN.
- 40 6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la molécula objetivo es una molécula objetivo de proteína y en donde el ensayo se selecciona del grupo que consiste en: ELISA, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, transferencia Western y espectrometría de masas.
- 45 7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el sujeto tiene síntomas consistentes con una infección bacteriana tal como la meningitis bacteriana, o en donde el sujeto carece de algunos o todos los síntomas consistentes con una infección bacteriana tal como la meningitis bacteriana.
- 50 8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde se cree que el sujeto tiene riesgo de desarrollar la meningitis bacteriana.
9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la etapa de determinación comprende usar los datos para calcular una o más funciones, donde se determina que la presencia de una infección bacteriana en el sujeto está presente si una o más de las funciones calculadas satisface una condición predeterminada.
- 55 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la una o más funciones incluyen una función lógica o una función lineal.
- 60 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la función lineal es una función discriminante lineal y, opcionalmente, en donde la condición predeterminada se satisface si la función discriminante lineal calculada supera un umbral predeterminado.
- 65 12. Un agente antibacteriano para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana del sistema nervioso central en un sujeto identificado como portador de una infección bacteriana del sistema nervioso central mediante un método de cualquier reivindicación anterior.
13. Un agente antibacteriano para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la infección bacteriana es la meningitis bacteriana.

Figura 1

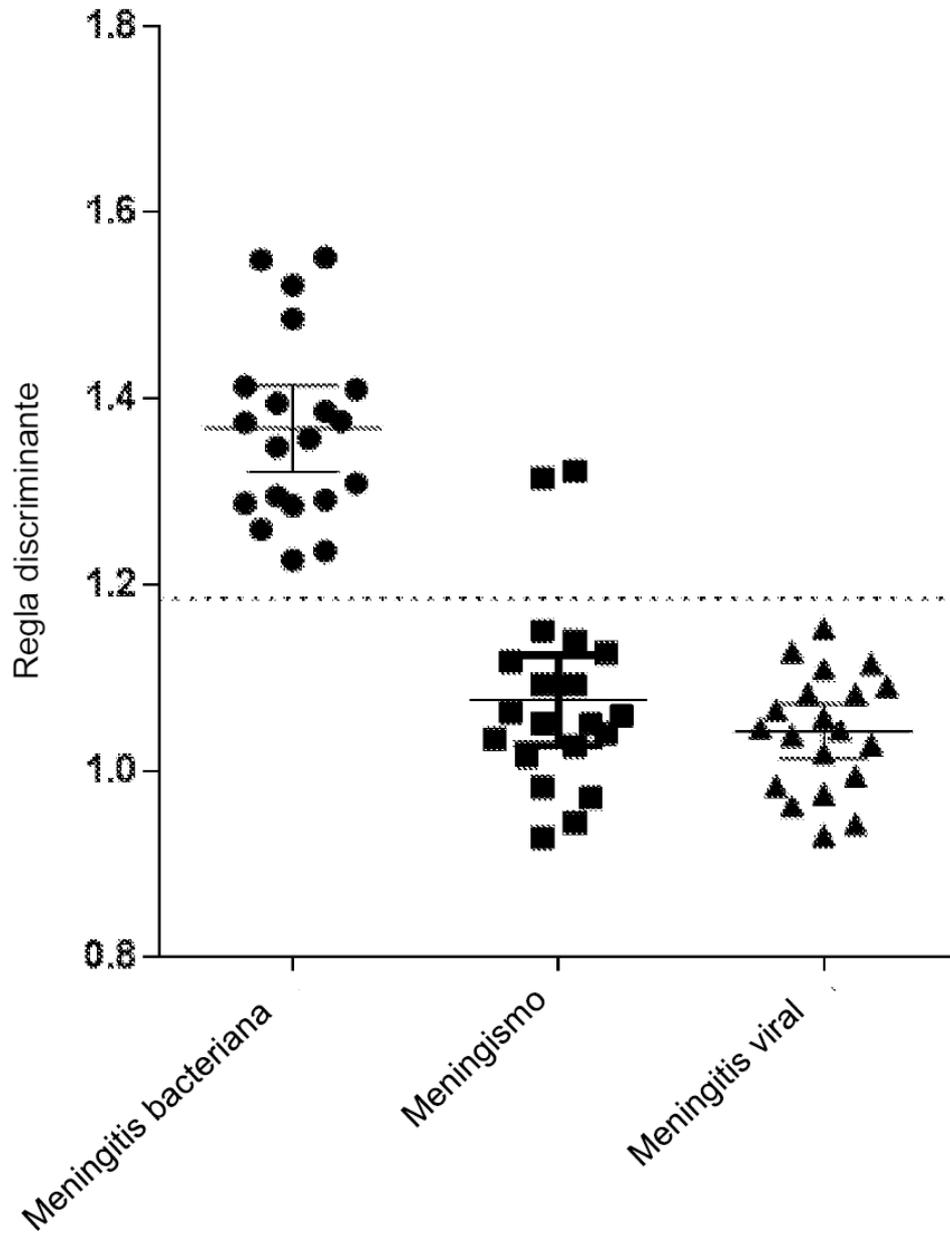


Figura 3

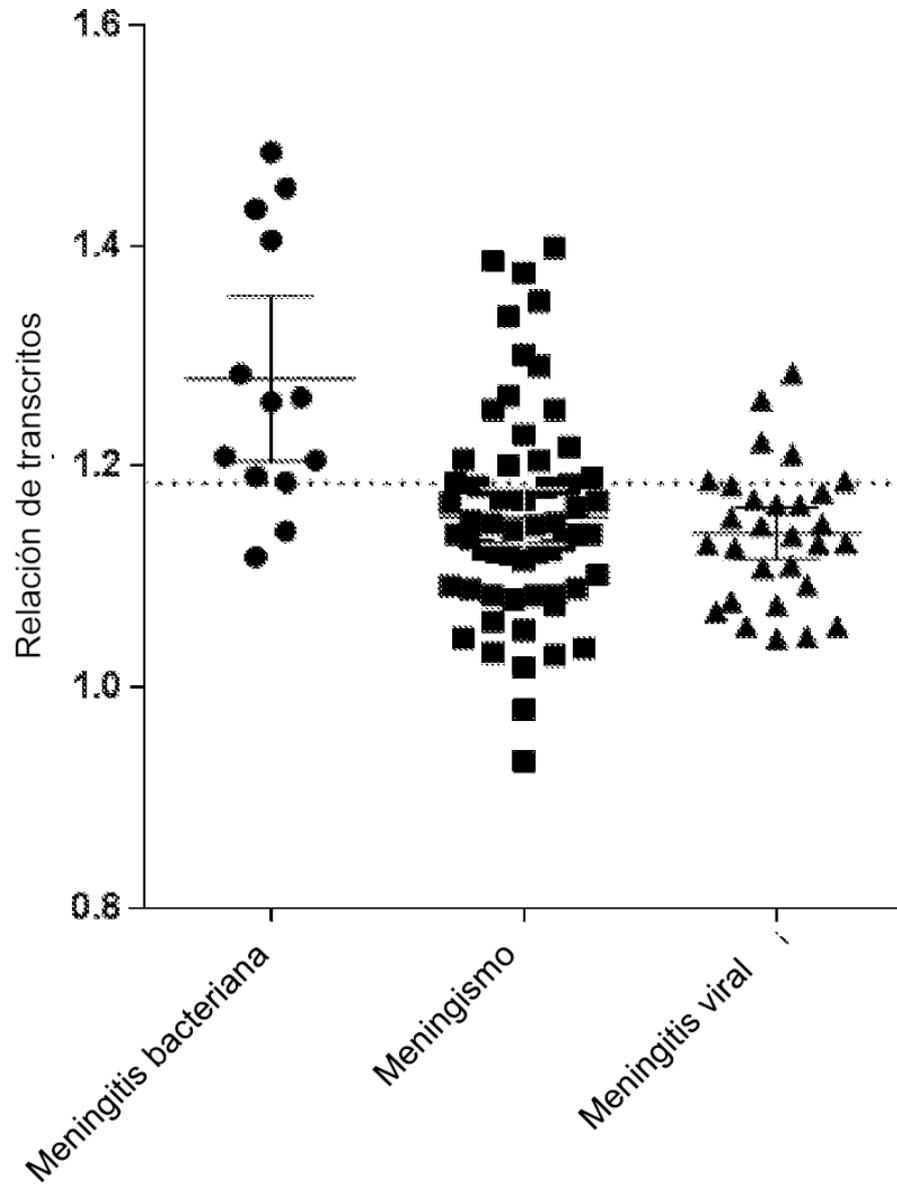


Figura 4

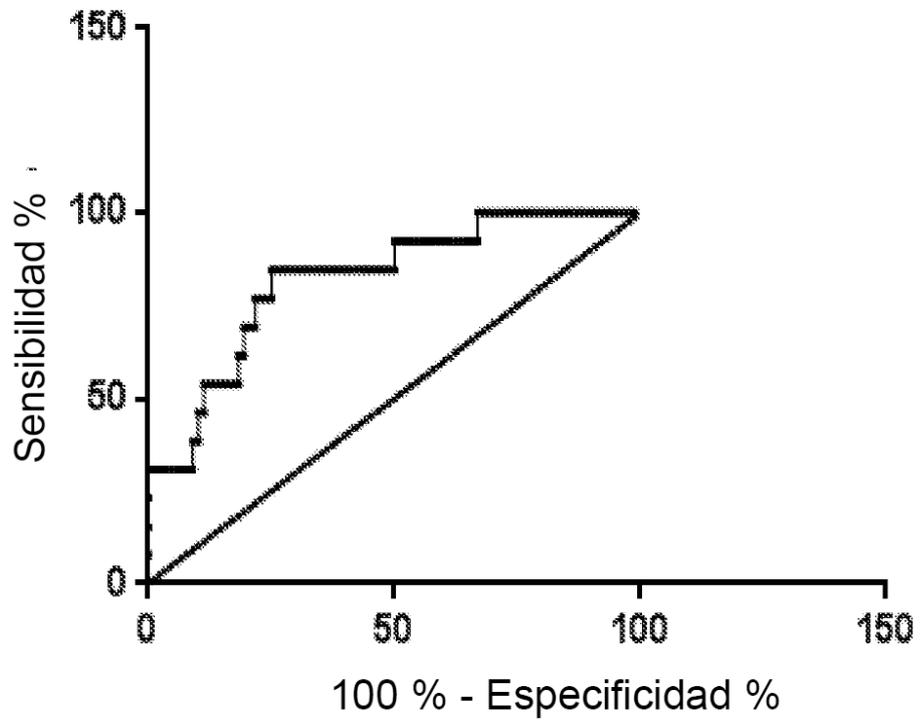


Figura 5

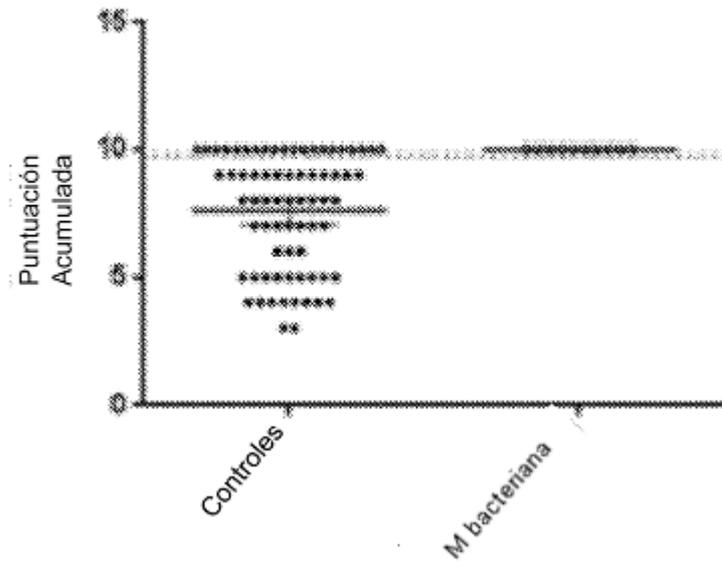


Figura 6

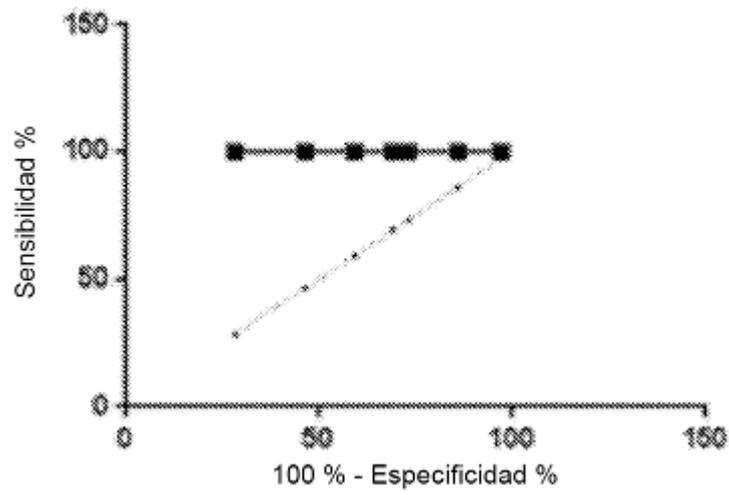


Figura 7

