

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 373**

21 Número de solicitud: 201830280

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

21.03.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.09.2019

Fecha de concesión:

27.02.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

05.03.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.0%)
Avda. Teniente Flomesta, 5
30003 Murcia (Murcia) ES**

72 Inventor/es:

**CERÓN MADRIGAL, José Joaquín;
PARDO MARÍN, Luis;
TECLES VICENTE, Fernando;
MARTÍNEZ SUBIELA, Silvia;
BERNAL GAMBÍN, Luis Jesús;
TVARIJONAVICIUTE, Asta;
ESCRIBANO TORTOSA, Damián y
PERES RUBIO, Camila**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **MÉTODO IN VITRO Y KIT PARA EVALUAR LA INMUNIDAD CELULAR**

57 Resumen:

Método in vitro y kit para evaluar la inmunidad celular. Se describe un procedimiento para evaluar directamente la inmunidad celular de un animal o ser humano, a partir de una muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares, como sangre entera o saliva, mediante la utilización de un panel de biomarcadores relacionados con el metabolismo oxidativo y/o la inflamación, obtenidos sometiendo las células mononucleares a estrés celular. Asimismo, se describe un kit que permite llevar a cabo dicho procedimiento de evaluación de la inmunidad celular.

ES 2 725 373 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

MÉTODO *IN VITRO* Y KIT PARA EVALUAR LA INMUNIDAD CELULAR

OBJETO DE LA INVENCION

5 El objetivo de la presente invención es desarrollar un método *in vitro* para evaluar directamente la inmunidad celular, en un ser humano o en un animal, mediante la utilización de un panel de biomarcadores relacionados con el metabolismo oxidativo y la inflamación, obtenidos de una muestra de células mononucleares sometidas a estrés celular mediante congelación. Asimismo, la invención se refiere también a un kit que permite llevar a cabo el procedimiento *in vitro* de evaluación de la inmunidad celular descrito en la presente
10 invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inmunidad celular es una respuesta adquirida y específica que está fundamentalmente mediada por linfocitos T. Esta inmunidad celular es fundamental para la defensa del
15 organismo y se encarga de destruir agentes patógenos o células infectadas por virus, bacterias o parásitos y células neoplásicas.

Por lo tanto, esta inmunidad defiende al organismo de padecer diversas enfermedades causadas por agentes vivos. Por ejemplo, en leishmaniosis humana y canina el correcto funcionamiento y activación de la inmunidad celular se ha asociado con un control de la
20 enfermedad y destrucción del parásito (Brelaz de Castro *et al.*, 2012). Y en la actualidad numerosas vacunas buscan activar dicha inmunidad celular.

Hasta ahora para evaluar la inmunidad celular se usan principalmente dos técnicas:

(a) Ensayos basados en la proliferación de linfocitos. Estos ensayos se basan en la
25 incubación de células mononucleares (linfocitos y monocitos) con distintas sustancias para el crecimiento de dichas células mononucleares. Estas sustancias suelen ser mitógenos (que inducen división celular) o antígenos (de la enfermedad que se quiere estudiar).

Posteriormente, se mide el crecimiento de dichas células mononucleares, como incremento de sus poblaciones y/o la producción de citoquinas como el interferón
30 gamma, IL-2 o IL-4 (Arce Fonseca *et al.*, 2013). Dentro de este sistema hay:

- a1. ensayos descritos como el “cytotoxic T lymphocyte assay” (Burleson *et al.*, 2010) donde se evalúa la respuesta de los linfocitos frente a antígenos T-dependientes;
- a2. ensayos disponibles comercialmente basados en ensayos de ELISPOT.

Dichos ensayos (a1, a2) suelen consistir en:

- 5 i. Añadir un anticuerpo de captura específico para el analito que se quiere determinar (normalmente citoquinas) unido a una placa ELISA.
- ii. Bloquear la placa normalmente con suero
- iii. Añadir a las células que se quieren estudiar un estimulante de la proliferación celular
- 10 iv. Incubar las placas para que las citoquinas segregadas sean capturadas por el anticuerpo unido a la placa ELISA.
- v. Lavar y añadir un anticuerpo de detección biotinado para permitir la detección de las citoquinas unidas al anticuerpo de la placa.
- vi. Visualizar las citoquinas mediante conjugados de avidina y un sustrato coloreado.
- 15 vii. Cada punto coloreado representa una célula secretora de citoquinas que puede ser contada de forma visual o automatizada.

Las citoquinas que se suelen determinar son IL-2, IL-4, IL-17, IFN- γ o TNF- α .

- (b) Recuentos por citometría de flujo de linfocitos CD4 y CD8 (Brelaz de Castro *et al.*, 2012). En este tipo de ensayo se marcan los linfocitos con anticuerpos específicos unidos a una molécula que es capaz de emitir una señal cuantificable y se mide el número de linfocitos marcados en un citómetro de flujo.

Por tanto, los ensayos para evaluar la inmunidad celular utilizados en la actualidad requieren, de manera general, la incubación de células del paciente y/o la utilización de citometría de flujo.

- 25 Es por ello que existe la necesidad de tener ensayos que puedan evaluar el estado de inmunidad celular de un individuo (ser humano o animal) que pueda ser efectuado directamente, sin necesidad de incubación o ensayos de proliferación y así obtener los resultados de dicho ensayo en breves períodos de tiempo. Por otro lado, también es de interés que dichos ensayos no requieran material de laboratorio o personal, especializados
- 30 (como es el caso cuando se requiere la utilización y el manejo de citómetros de flujo).

DESCRIPCIÓN

La presente invención describe un método *in vitro* para evaluar directamente la inmunidad celular a partir de un panel de biomarcadores (analitos) relacionados con el metabolismo oxidativo y la inflamación, obtenidos de una muestra de células mononucleares, separadas de una muestra de fluido biológico, y sometidas a estrés celular mediante congelación.

Este método:

- no requiere la utilización de un citómetro de flujo, con lo que los costes son menores;
- no requiere incubación, ni cultivo de las células, ni la adición de antígenos, por lo que el tiempo para obtener un resultado es más reducido;
- no requiere personal especializado.

Otra característica del método de la invención es que la evaluación de estos biomarcadores o analitos se puede determinar, tanto de forma absoluta, como de forma relativa. Se estiman, por tanto, los valores de cada biomarcador por célula mononuclear de la muestra, en particular los valores de cada biomarcador por linfocito y los valores absolutos de dicho biomarcador, en el conjunto de la muestra. Esto hace que sea un ensayo más sensible que si solamente se expresase sólo mediante valores absolutos, ya que los valores relativos miden la capacidad de respuesta inmunitaria celular de cada célula.

La presente invención se refiere por tanto a un método *in vitro* para evaluar la inmunidad celular a partir de una muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares, de un animal o de un ser humano, donde dicho método comprende:

- i. separar las células mononucleares de la muestra de fluido biológico;
- ii. suspender las células mononucleares separadas en una solución salina;
- iii. cuantificar las células mononucleares presentes en la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii);
- iv. congelar la solución salina de células mononucleares;
- v. descongelar la solución salina de células mononucleares y realizar a continuación una centrifugación;
- vi. recoger el líquido sobrenadante resultante de la centrifugación del paso (v); y
- vii. determinar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo en el líquido sobrenadante recogido en el paso (vi)

- viii. comparar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo determinado el paso (viii) con el contenido medio de referencia del mismo analito que se obtiene al reproducir dicho método en las mismas condiciones a partir de al menos dos muestras del mismo tipo de fluido biológico que comprenden células mononucleares de animales o de seres humanos sanos.

5

En una realización, el método *in vitro* de la invención comprende:

- i. separar las células mononucleares de la muestra de fluido biológico añadiendo dicha muestra sobre una solución separadora de células mononucleares y someterla a centrifugación;
- ii. recoger la fase que contiene las células mononucleares de la muestra, comprendida entre la fase superior y la fase inferior formadas en la centrifugación, y suspenderla en una solución salina;
- iii. cuantificar las células mononucleares presentes en la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii);
- iv. congelar la solución salina de células mononucleares;
- v. descongelar la solución salina de células mononucleares dejándola reposar a temperatura ambiente y realizar a continuación una centrifugación;
- vi. recoger el líquido sobrenadante resultante de la centrifugación del paso (v); y
- vii. determinar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo en el líquido sobrenadante recogido en el paso (vi)
- viii. comparar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo determinado el paso (viii) con el contenido medio de referencia del mismo analito que se obtiene al reproducir dicho método en las mismas condiciones a partir de al menos dos muestras del mismo tipo de fluido biológico que comprende células mononucleares de animales o de seres humanos sanos.

10

15

20

25

En una realización del método *in vitro* de la invención, la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares es una muestra de saliva.

30 En una realización del método *in vitro* de la invención, la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares es una muestra de sangre entera.

En una realización del método *in vitro* de la invención, la muestra de sangre entera se trata previamente con un anticoagulante. A efectos de la presente invención, *el* término

anticoagulante se refiere a cualquier sustancia adecuada para inhibir la coagulación natural de la sangre donde, si no se pone en contacto con dicha sustancia, la sangre pierde su liquidez, convirtiéndose en un gel y formando coágulos.

5 A efectos de la presente invención, la muestra de sangre entera puede ser tratada previamente con cualquier anticoagulante utilizado en determinaciones hematológicas y bioquímicas rutinarias.

En una realización del método *in vitro* de la invención dicho anticoagulante es ácido etilendiamino tetraacético (EDTA). En otra realización del método *in vitro* de la invención dicho anticoagulante es heparina.

10 A efectos de la presente invención, los anticoagulantes se emplean preferiblemente a las concentraciones descritas en el estado de la técnica para determinaciones hematológicas y bioquímicas rutinarias.

En otra realización del método *in vitro* de la invención, dicho anticoagulante es una solución de citrato, y la muestra de sangre entera se diluye en una relación 1:10 en volumen con
15 dicha solución de citrato. En una realización del método *in vitro* de la invención, cuando se utiliza como anticoagulante una solución de citrato y la muestra de sangre entera se diluye en relación 1:10 con dicha solución de citrato, los valores de los analitos determinados en el paso (vii) del método de la invención deben ser multiplicados por 10.

En una realización del método *in vitro* de la invención, la solución de citrato se emplea
20 preferiblemente a las concentraciones descritas en el estado de la técnica para determinaciones hematológicas y bioquímicas rutinarias.

En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (i) comprende separar las células mononucleares de la muestra de fluido biológico añadiendo dicha muestra sobre una solución separadora de células mononucleares y someterla a centrifugación.

25 En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (i) comprende separar las células mononucleares de la muestra de fluido biológico mediante cualquier medio o procedimiento separador que permita una separación de las células mononucleares y someterla a centrifugación.

En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (i), comprende separar las
30 células mononucleares de la muestra de fluido biológico mediante gradiente de densidad y someterla a centrifugación.

En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (i), comprende separar las células mononucleares de la muestra de fluido biológico añadiendo dicha muestra de fluido biológico sobre un medio separador de células mononucleares y someterla a centrifugación.

5 En una realización del método *in vitro* de la invención, el medio separador de células mononucleares tiene una densidad de 1077 mg/ml.

A título indicativo, y no limitante, medios separadores adecuados para llevar a cabo el método *in vitro* de la invención incluyen medios preparados en el propio laboratorio o medios comerciales como Histopaque® o Ficoll®.

10 En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (i), comprende separar las células mononucleares añadiendo la muestra de fluido biológico sobre un medio separador de células mononucleares y someterla a una centrifugación de entre 1000 a 2000 rpm. En una realización más preferente del método *in vitro* de la invención, dicha centrifugación se realiza durante al menos 15 minutos. En una realización aún más preferente del método *in vitro* de la invención, dicha centrifugación se realiza durante al menos 30 minutos

15 En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (ii) comprende recoger la fase que contiene las células mononucleares de la muestra de fluido biológico, comprendida entre la fase superior y la fase inferior formadas en la centrifugación, y suspenderla en una solución salina con una concentración en sal equivalente a la concentración salina en el interior de las células. Dicha solución salina que contiene una concentración en sal
20 equivalente a la concentración salina en el interior de las células se denomina también solución salina normal o suero fisiológico. En una realización más preferente del método *in vitro* de la invención, dicha solución salina comprende agua destilada y cloruro sódico al 0.9% (p/v).

25 En una realización del método *in vitro* de la invención, cuando la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares es una muestra de sangre entera, la solución salina es de un volumen igual al volumen inicial de muestra de sangre después de la adición del anticoagulante.

30 En una realización del método *in vitro* de la invención, cuando la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares es una muestra de sangre entera, la relación entre el volumen de solución salina y el volumen de muestra de sangre entera después de la adición del anticoagulante es una relación 1:1.

En una realización del método *in vitro* de la invención, cuando la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares es una muestra de sangre entera, la relación entre el volumen de solución salina y el volumen de muestra de sangre entera después de la adición del anticoagulante es diferente a una relación 1:1 en volumen.

- 5 De manera general, en el método *in vitro* de la invención, la relación de volumen entre la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares y la solución salina debe estar comprendida en un rango que permita la detección de los analitos mediante los métodos empleados para su cuantificación. En una realización de la invención, el volumen total de la muestra de fluido biológico y la solución salina debe ser al menos de 0,5 ml. En
10 otra realización del método *in vitro* de la invención, el volumen total de la muestra de fluido biológico y la solución salina es de 0,5 ml o incluso menor, dependiendo de si el analito a medir y la técnica de medición del mismo así lo permiten.

- En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (iii) comprende cuantificar las células mononucleares presentes en la solución salina de células mononucleares obtenida
15 en el paso (ii) en cualquier analizador de hematología que permita realizar recuentos de células mononucleares. Ejemplos de dichos analizadores comprenden, pero no se limitan a analizadores de impedancia eléctrica, centrífugos o basados en tecnología láser. En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (iii) comprende cuantificar las células mononucleares presentes en la solución salina de células mononucleares obtenida en el
20 paso (ii) en un analizador de hematología que se selecciona independientemente entre un analizador de impedancia eléctrica, un analizador centrífugo o un analizador basado en tecnología láser.

- Por tanto, la realización de dicho paso (iii), de acuerdo con el método *in vitro* de la invención, no requiere la utilización de un analizador de hematología basado en la técnica de citometría
25 de flujo.

- En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (iv) comprende congelar la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii) a -20°C. En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (iv) comprende congelar las células mononucleares durante al menos 1 hora.

- 30 Esto permite que el método *in vitro* de la invención pueda ser realizado en un laboratorio o clínica sin necesidad de un congelador de -80°C y de una forma rápida.

En otras realizaciones del método *in vitro* de la invención el paso (iv) comprende congelar la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii) a -20°C durante al menos

1 hora, al menos 2 horas, al menos 5 horas, al menos 8 horas, al menos 24 horas, o más de 24 horas; a -80°C durante al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 5 horas, al menos 8 horas, al menos 24 horas, o más de 24 horas; o durante cualquier tiempo que permita congelar la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii).

- 5 El método *in vitro* de la invención también se puede llevar a cabo realizando el paso (iv) a menos de -15°C, a -15°C, a -20°C, a -30°C, a -45°C, a -65°C o a cualquier temperatura en las que se produzca la congelación de la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii).

10 En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (v) comprende descongelar la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii) dejándola reposar a temperatura ambiente y realizar a continuación una centrifugación.

Se define, a efectos de la presente invención, temperatura ambiente como una temperatura comprendida entre 10°C y 30°C.

15 En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (v) comprende descongelar la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii) dejándola reposar a temperatura ambiente durante media hora, y realizar a continuación una centrifugación. En otra realización del método *in vitro* de la invención, el paso (v) comprende descongelar la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii) dejándola reposar a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos, al menos 40 minutos, al menos 50 minutos, al menos 1 hora; o durante el tiempo necesario para su descongelación, y realizar a continuación una centrifugación.

25 En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (v) comprende descongelar la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii) y realizar a continuación una centrifugación al menos a 1700 rpm. En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (v) comprende realizar a continuación una centrifugación entre 1500 a 15000 rpm. En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (v) comprende realizar a continuación una centrifugación entre 1500 y 10000 rpm. En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (v) comprende realizar una centrifugación entre 1500 y 3000 rpm.

30 En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (v) comprende descongelar la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii) dejándola reposar a temperatura ambiente y realizar una centrifugación durante al menos 5 minutos a, al menos, 1700 rpm.

En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (vi) comprende recoger el líquido sobrenadante resultante de la centrifugación del paso (v).

5 En una realización del método *in vitro* de la invención, el paso (vii) comprende determinar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo en el líquido sobrenadante recogido en el paso (vi) con la utilización de métodos previamente descritos en el estado de la técnica para dicho analito. Dichos métodos pueden ser espectrofotométricos o inmunológicos. Por ejemplo, para determinar la ferritina, en el método *in vitro* de la invención, se puede emplear un método inmunológico que tenga como reactivo un anticuerpo que permita detectar la ferritina. O para determinar los oxidantes 10 totales (TOS), en el método *in vitro* de la invención, se puede usar un método espectrofotométrico en el que uno de los reactivos lleve o-dianisidina que reacciona con los oxidantes de la muestra y produce variación de color. También se pueden emplear, en el método *in vitro* de la invención, otros reactivos que reaccionen con los oxidantes de la muestra. Estos métodos se pueden llevar a cabo en el propio laboratorio o estar disponibles 15 comercialmente.

Los analizadores de bioquímica llevan a cabo diferentes tipos de evaluaciones entre las que se encuentran determinaciones espectrofotométricas, de inmunoturbidez, determinación selectiva de iones, entre otras.

20 Ejemplos no limitantes de analizadores de bioquímica son analizadores automatizados de bioquímica (ej. Olympus A400, Olympus 600), analizadores manuales de bioquímica (cualquier espectrofotómetro convencional) o lectores espectrofotométricos de microplacas (ej. Biotech, Tecan).

En una realización del método *in vitro* de la invención, la determinación del al menos un analito del paso (vii) se lleva a cabo en espectrofotómetros manuales o automatizados.

25 En una realización del método *in vitro* de la invención, en el paso (vii) se determina el contenido, total y/o el contenido en relación con el número de células mononucleares cuantificado en el paso (iii), de al menos un analito indicador de inflamación, y/o estrés oxidativo.

30 En una realización del método *in vitro* de la invención, las células mononucleares son linfocitos.

A efectos de la presente invención, el término “analito indicador de inflamación” se refiere a un analito existente en dichas células mononucleares que varía en su concentración cuando

en dichas células se produce inflamación. Un ejemplo de dicho analito indicador de inflamación es, por ejemplo, la ferritina.

A efectos de la presente invención, el término “analito indicador de estrés oxidativo” se refiere a un analito existente en dichas células mononucleares que varía en su
5 concentración cuando en dichas células se produce estrés oxidativo. Un ejemplo de dicho analito indicador de estrés oxidativo es, por ejemplo, la concentración de antioxidantes totales (TOS).

En una realización del método *in vitro* de la invención, en el paso (vii) se determina al menos un analito indicador de inflamación y/o estrés oxidativo que se selecciona
10 independientemente entre el grupo que consiste en ferritina, proteína C reactiva, haptoglobina, mieloperoxidasa, oxidantes totales (TOS), capacidad antioxidante reductora de ion cúprico (CUPRAC), paraoxonasa-1 (PON1), interleuquinas, antioxidantes totales (TAC), estatus antioxidante del hierro (FRAP), esterasa total (TEA), catalasa, nitrito, tiol u óxido nítrico; o combinaciones de los mismos. En una realización las interleuquinas se
15 seleccionan entre IL-2, IL-4, IL-17 IFN- γ o TNF- α . De forma general se puede determinar cualquier analito relacionado con inflamación, estrés oxidativo o interleuquinas.

De manera general, el método *in vitro* de la invención incluye la determinación de al menos un analito indicador de inflamación y/o estrés oxidativo, pueden existir variaciones en la
20 respuesta de analitos individuales dependiendo de la enfermedad o de la situación clínica y algunos analitos pueden ser más sensibles que otros en dicha enfermedad o dicha situación clínica. Por ejemplo, en situaciones de inflamación aguda la determinación de la proteína C reactiva es más adecuada que la de la haptoglobina, mientras que en la inflamación crónica la determinación de la haptoglobina proporciona un resultado más sensible. Dependiendo de la posible enfermedad del animal o ser humano del cual proviene la muestra de sangre
25 entera, se escogerán los analitos adecuados para la determinación de su estado inmunológico.

En otra realización del método *in vitro* de la invención, en el paso (vii) se determina un analito relacionado con inflamación seleccionado independientemente entre la ferritina, una
30 proteína de fase aguda como la proteína C reactiva o una o más interleuquinas; o combinaciones de los mismos. En una realización, las interleuquinas se seleccionan entre IL-2, IL-4, IL-17 IFN- γ o TNF- α , aunque se puede usar cualquier interleuquina para la que haya un método disponible.

En otra realización del método *in vitro* de la invención, en el paso (vii) se determina un analito relacionado con el estrés oxidativo seleccionado independientemente entre oxidantes totales (TOS), antioxidantes totales (TAC), mieloperoxidasa, estatus antioxidante del hierro (FRAP), capacidad antioxidante reductora de ion cúprico (CUPRAC), paraoxonasa-1 (PON1), esterasa total (TEA), catalasa, nitrito, tiol u óxido nítrico; o combinaciones de los mismos o cualquier otro marcador del estado oxidativo para el que haya un método disponible.

En otra realización del método *in vitro* de la invención, en el paso (vii) se determina el contenido de un analito relacionado con el estrés oxidativo seleccionado independientemente entre mieloperoxidasa, estatus antioxidante del hierro (FRAP), capacidad antioxidante reductora de ion cúprico (CUPRAC) y paraoxonasa-1 (PON1).

En otra realización del método *in vitro* de la invención, en el paso (vii) se determina el contenido de ferritina, oxidantes totales (TOS), mieloperoxidasa, estatus antioxidante del hierro (FRAP), capacidad antioxidante reductora de ion cúprico (CUPRAC) y paraoxonasa-1 (PON1).

En una realización del método *in vitro* de la invención, en el paso (vii) se determina el contenido de al menos ferritina y oxidantes totales (TOS).

En el paso (viii) del método *in vitro* de la invención se compara el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo determinado el paso (viii) con el contenido medio de referencia del mismo analito que se obtiene al reproducir dicho método en las mismas condiciones a partir de al menos dos muestras de fluido biológico de animales o de seres humanos sanos.

Tal como se observa en el Ejemplo 1, se lleva a cabo el método de la invención en las mismas condiciones en una muestra de sangre entera, tanto de animales (perros) sanos, como de animales enfermos (leishmaniosis). Los resultados muestran que los animales enfermos obtienen valores de ferritina y TOS mucho más elevados (por célula mononuclear) que los animales sanos (Tabla 1), siendo por tanto dicho aumento en estos análisis un indicador del estado inmunitario de dichos animales. En concreto, en el grupo de perros analizados en el Ejemplo 1, se puede determinar, de manera general que valores mayores de 25 µg/l de ferritina en 10³ células/µl y mayores de 60 µg/l de TOS en 10³ células/µl son indicativos de animales enfermos con leishmaniasis.

Los resultados de las tablas 2 y 3 muestran que la determinación de los niveles de CUPRA, FRAP, TEA, catalasa y mieloperoxidasa, también muestran valores más elevados en los

animales enfermos, y en muchos casos el incremento de dichos valores, en relación al número de células mononucleares de la muestra, es del orden de 10 veces más que en animales sanos.

5 Por otro lado, las condiciones particulares de congelación, en los rangos de temperaturas y tiempos descritos en la presente descripción, provoca que las células mononucleares liberen analitos al medio, tal como se observa en el Ejemplo 2, de manera que pueden ser utilizados para establecer el estado inmunitario celular del sujeto.

Tal como se puede apreciar en el Ejemplo 3, a mayores tiempos de congelación, se obtiene mayores valores de los analitos medidos.

10 Por otro lado, tal como se observa en el Ejemplo 4, las muestras de líquido sobrenadante obtenidas, una vez descongeladas las células mononucleares y centrifugadas son estables durante al menos 24 h, tanto congeladas como a temperatura ambiente, haciendo que el método sea flexible a la hora de determinar un conjunto más o menos extenso de analitos, y permite que se puedan determinar los analitos en los sobrenadantes recogidos en el paso
15 (vi) del método *in vitro* de la invención justo tras realizar dicho paso (vi) o más tarde, y también es posible su transporte para que la determinación de los analitos se realice en otros laboratorios.

Otra realización de la invención se refiere a un kit de evaluación de inmunidad celular a partir de una muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares de un
20 animal o de un ser humano, que comprende:

- a. un primer soporte que comprende una solución separadora de células mononucleares mediante gradiente de densidad;
- b. un segundo soporte que comprende una solución salina;
- c. un tercer soporte adecuado para cuantificar un analito en un analizador de
25 bioquímica o en un espectrofotómetro o en un lector de microplacas;

donde dicho kit comprende además instrucciones, en el que dichas instrucciones comprenden:

- i. añadir sin mezclar la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares sobre la solución separadora de células mononucleares del
30 primer soporte y someterla a una centrifugación;

- ii. recoger las células mononucleares de la muestra de fluido biológico de la interfase existente entre el sobrenadante y el pellet formados en la centrifugación, y suspenderlas en la solución salina del segundo soporte;
- iii. cuantificar las células mononucleares presentes en la solución salina de células mononucleares del segundo soporte obtenida en el paso (ii);
- iv. congelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte;
- v. descongelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte dejándolo reposar a temperatura ambiente y realizar a continuación una centrifugación;
- vi. recoger el líquido sobrenadante resultante de la centrifugación del paso (v) y depositarlo en el tercer soporte; y
- vii. determinar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo en el líquido sobrenadante recogido en el paso (vi)
- viii. comparar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo determinado el paso (viii) con el contenido medio de referencia del mismo analito que se obtiene al reproducir dicho método en las mismas condiciones a partir de al menos dos muestras del mismo tipo de fluido biológico de animales o de seres humanos sanos.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones comprenden que la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares es una muestra de saliva.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones comprenden que la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares es una muestra de sangre entera.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (i) comprenden añadir sin mezclar una muestra de sangre entera, tratada previamente con un anticoagulante, sobre la solución separadora de células mononucleares del primer soporte y someterla a una centrifugación.

A efectos de la presente invención, las instrucciones del paso (i) comprenden que la muestra de sangre entera puede ser tratada previamente con cualquier anticoagulante utilizado en determinaciones hematológicas y bioquímicas rutinarias.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones comprenden que dicho anticoagulante es ácido etilendiamino tetraacético (EDTA). En otra realización del kit de la invención, las instrucciones comprenden que dicho anticoagulante es heparina.

En otra realización del kit de la invención, las instrucciones comprenden que dicho anticoagulante es una solución de citrato, y la muestra de sangre entera se diluye 1:10 con dicha solución de citrato. En otra realización del kit de la invención, las instrucciones comprenden que cuando se utiliza como anticoagulante una solución de citrato y la muestra de sangre entera se diluye en relación 1:10 con dicha solución de citrato, los valores de los analitos determinados en el paso (vii) de las instrucciones del kit invención deben ser multiplicados por 10.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (i) comprenden que la solución separadora del primer soporte tiene una densidad de 1077 mg/ml.

De manera general, el primer soporte del kit de la invención puede comprender cualquier solución separadora que permita una separación correcta de las células mononucleares. A título indicativo, y no limitante, las instrucciones del kit de la invención pueden incluir que cualquier solución separadora es adecuada para separar células mononucleares, incluyendo medios preparados en el propio laboratorio o medios comerciales como Histopaque® o Ficoll®.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (i) comprenden que el volumen de la muestra de fluido biológico es igual al volumen la solución separadora de células mononucleares. Es decir, la muestra de fluido biológico y la solución separadora de células mononucleares se encuentran en una relación 1:1 en volumen.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (i), cuando la muestra de fluido biológico es una muestra de sangre entera, comprenden que el volumen de la muestra de sangre entera después de la adición del anticoagulante es igual al volumen la solución separadora de células mononucleares.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (i) comprenden añadir sin mezclar una muestra de fluido biológico sobre la solución separadora de células mononucleares del primer soporte y someterla a una centrifugación.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (i) comprenden añadir sin mezclar una muestra de fluido biológico sobre la solución separadora de células mononucleares del primer soporte y someterla a una centrifugación a entre 1000 a 2000 rpm. En una realización del kit de la invención, las instrucciones comprenden que dicha centrifugación se realiza durante al menos 15 minutos. En otra realización del kit de la invención, las instrucciones comprenden que dicha centrifugación se realiza durante al menos 30 minutos.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (ii) comprenden recoger las células mononucleares de la muestra de fluido biológico de la interfase existente entre el sobrenadante y el pellet formados en la centrifugación, y suspenderlas en la solución salina del segundo soporte.

- 5 En una realización del kit de la invención, la solución salina del segundo soporte comprende una concentración en sal equivalente a la concentración salina en el interior de las células. Dicha solución salina que contiene una concentración en sal equivalente a la concentración salina en el interior de las células se denomina también solución salina normal o suero fisiológico. En una realización más preferente del kit de la invención dicha solución salina
10 comprende agua destilada y cloruro sódico al 0.9% (p/v).

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (ii) comprenden recoger las células mononucleares de la muestra de fluido biológico de la interfase existente entre el sobrenadante y el pellet formados en la centrifugación, y suspenderlas en una solución salina de volumen igual al volumen inicial de muestra

- 15 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (ii), cuando la muestra de fluido biológico es una muestra de sangre entera, comprenden recoger las células mononucleares de la muestra de sangre entera de la interfase existente entre el sobrenadante y el pellet formados en la centrifugación, y suspenderlas en una solución salina de volumen igual al volumen inicial de muestra de sangre después de la adición del
20 anticoagulante.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (ii), cuando la muestra de fluido biológico es una muestra de sangre entera, comprenden que la relación entre el volumen de solución salina y el volumen de muestra de sangre entera después de la adición del anticoagulante es 1:1.

- 25 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (ii), cuando la muestra de fluido biológico es una muestra de sangre entera, comprenden que la relación entre el volumen de solución salina y el volumen de muestra de sangre entera después de la adición del anticoagulante es diferente a una relación 1:1 en volumen.

- En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (ii) comprenden que la
30 relación de volumen entre la muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares y la solución salina debe estar comprendida en un rango que permita la detección de los analitos mediante los métodos empleados para su cuantificación. En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (ii) comprenden que, el volumen

total de la muestra de fluido biológico y la solución salina debe ser al menos de 0,5 ml. En otra realización las instrucciones del paso (ii) del kit de la invención, comprenden que el volumen total de la muestra de fluido biológico y la solución salina es de 0,5 ml o incluso menor, dependiendo de si el analito a medir y la técnica de medición del mismo así lo permiten.

5

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (iii) comprenden cuantificar las células mononucleares presentes en la solución salina de células mononucleares del segundo soporte obtenida en el paso (ii) en cualquier analizador de hematología que permita realizar recuentos de células mononucleares.

10 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (iv) comprenden congelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte a -20°C . En una realización, las instrucciones del paso (iv) comprenden congelar las células mononucleares en el segundo soporte durante al menos 1 hora.

15 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (iv) comprenden congelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte a -20°C durante al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 5 horas, al menos 8 horas, al menos 24 horas, o más de 24 horas; a -80°C durante al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 5 horas, al menos 8 horas, durante al menos 24 horas, o durante más de 24 horas; o durante cualquier tiempo que permita congelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte.

20

En otras realizaciones del kit de la invención, las instrucciones del paso (iv) comprenden congelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte a -15°C , a -20°C , a -30°C , a -45°C , a -65°C , o a cualquier temperatura en la que se produzca la congelación de la solución salina de células mononucleares del segundo soporte.

25 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (v) comprenden descongelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte dejándola reposar a temperatura ambiente y realizar a continuación una centrifugación.

30 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (v) comprenden descongelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte dejándola reposar a temperatura ambiente durante media hora y realizar a continuación una centrifugación. En otras realizaciones del kit de la invención, las instrucciones del paso (v), las instrucciones comprenden descongelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte dejándola reposar a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos, al

menos 40 minutos, al menos 50 minutos, o al menos 1 hora; o durante cualquier tiempo que permita descongelar de la solución salina de células mononucleares del segundo soporte, y realizar a continuación una centrifugación.

5 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (v) comprenden descongelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte dejándola reposar a temperatura ambiente y realizar a continuación una centrifugación a al menos 1700 rpm. En otra realización del kit de la invención, las instrucciones comprenden, en relación a la centrifugación del paso (v), que la misma se realiza a entre 1500 a 15000 rpm. En una realización más del kit de la invención, las instrucciones comprenden, en relación a
10 la centrifugación del paso (v), que la misma se realiza a entre 1500 y 10000 rpm. En una realización dicha centrifugación del paso (v) se realiza a entre 1500 y 3000 rpm.

En una realización más del kit de la invención, las instrucciones comprenden, en relación a la centrifugación del paso (v), que la misma se realiza durante al menos 5 minutos a, al menos, 1700 rpm.

15 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vi) comprenden recoger el líquido sobrenadante resultado de la centrifugación del paso (v).

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vii) comprenden determinar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo en dicho líquido sobrenadante.

20 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vii) comprenden determinar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo en el líquido sobrenadante resultado de la centrifugación del paso (vi) con la utilización de métodos previamente descritos en el estado de la técnica para dicho analito. Dichos métodos pueden ser espectrofotométricos o inmunológicos.

25 Los métodos de determinación del contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo incluidos en las instrucciones del kit de la invención en relación al paso (vii), pueden llevarse a cabo utilizando cualquier analizador de bioquímica. Se pueden usar analizadores automatizados de bioquímica (ej. Olympus A400, Olympus 600), o lectores espectrofotométricos de microplacas (ej. Biotech, Tecan).

30 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vii) comprenden determinar al menos un analito en espectrofotómetros manuales o automatizados.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vii) comprenden determinar el contenido, total y/o el contenido en relación con el número de células mononucleares cuantificado en el paso (iii), de al menos un analito indicador de inflamación, y/o estrés oxidativo.

- 5 En una realización del kit de la invención, las instrucciones indican que las células mononucleares separadas en el paso (i) son linfocitos.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vii) comprenden determinar al menos un analito indicador de inflamación y/o estrés oxidativo que se selecciona independientemente entre el grupo que consiste ferritina, proteína C reactiva, haptoglobina, mieloperoxidasa, oxidantes totales (TOS), capacidad antioxidante reductora de ion cúprico (CUPRAC), paraoxonasa-1 (PON1), interleuquinas, antioxidantes totales (TAC), estatus antioxidante del hierro (FRAP), esterasa total (TEA), catalasa, nitrito, tiol u óxido nítrico; o combinaciones de los mismos. En una realización las interleuquinas se seleccionan entre IL-2, IL-4, IL-17 IFN- γ o TNF- α .

- 15 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vii) comprenden determinar un analito relacionado con inflamación seleccionado independientemente entre la ferritina, una proteína de fase aguda como la proteína C reactiva o una o más interleuquinas; o combinaciones de los mismos. En una realización, las interleuquinas se seleccionan entre IL-2, IL-4, IL-17 IFN- γ o TNF- α .

- 20 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vii) comprenden determinar un analito relacionado con el estrés oxidativo seleccionado independientemente entre oxidantes totales (TOS), antioxidantes totales (TAC), estatus antioxidante del hierro (FRAP), esterasa total (TEA), catalasa, nitrito, tiol u óxido nítrico; o combinaciones de los mismos.

- 25 En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vii) comprenden determinar un analito relacionado con el estrés oxidativo seleccionado independientemente entre mieloperoxidasa, estatus antioxidante del hierro (FRAP), capacidad antioxidante reductora de ion cúprico (CUPRAC), paraoxonasa-1 (PON1).

- En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (vii) comprenden
30 determinar el contenido de al menos ferritina y TOS.

En una realización del kit de la invención, las instrucciones del paso (viii) comprenden comparar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de

estrés oxidativo determinado el paso (viii) con el contenido medio de referencia del mismo analito que se obtiene al reproducir dicho método en las mismas condiciones a partir de al menos dos muestras del mismo tipo de fluido biológico de animales o de seres humanos sanos.

5

EJEMPLOS

Los ejemplos descritos a continuación tienen carácter ilustrativo y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1: Utilización del método in vitro de la invención para evaluar la inmunidad celular de perros sanos y de enfermos de leishmaniosis.

Se tomaron muestras de sangre entera de 4 perros enfermos con leishmaniosis (enfermedad que produce un descenso en la inmunidad celular) y 4 perros sanos y se llevó a cabo el método in vitro de la invención, para establecer el estado inmunitario celular de éstos.

15

Los perros enfermos procedían de la clínica Dinos y la clínica Dr. Bernal de Murcia (España) y fueron diagnosticados de leishmania por serología y PCR. Estaban en el estadio clínico 3 según la guía del grupo leishvet. Los perros sanos eran perros que vinieron a clínica para chequeos periódicos de rutina, no mostraban signos clínicos externos y eran negativos a leishmania por serología y PCR. En ningún caso habían recibido tratamiento en los últimos 6 meses.

20

Se determinó tanto el contenido total de un marcador de inflamación (ferritina) y un marcador de estrés oxidativo (TOS), como el contenido de dichos marcadores relativo al número de linfocitos de la muestra. La ferritina se determinó mediante un método inmunoturbidimétrico, que usa un anticuerpo específico contra la ferritina para su cuantificación, usando un kit comercial de la casa Roche (Tina-quant Ferritin Gen 4. Roche Diagnostics GmbH), aunque se puede determinar por cualquier método capaz de cuantificar ferritina. El TOS se determinó usando un sustrato que al reaccionar con los oxidantes de la muestra produce color, siguiendo el método descrito por Erel (Erel's TOS, 2005) aunque se puede determinar por cualquier método capaz de cuantificar el TOS.

25

30

Los resultados se muestran en la **Tablas 1A y 1B**:

ID	Linfocitos (x10 ³ cell/μl)	Ferritina (μg/l)	Ferr/Linf (μg/l)/(10 ³ cell/μl)	TOS (μmol/l)	TOS/Linf (μmol/l)/(10 ³ cell/μL)
Sano 1 (4563)	1,11	19,9	17,93	38,4	34,59
Sano 2 (7851)	1,35	17,9	13,26	40,3	29,85
Sano 3 (1587)	0,52	11,3	21,73	29,7	57,12
Sano 4 (5793)	0,72	13,1	18,19	29,9	41,53
Enfermo 1 (3547)	0,49	30,2	61,63	44,1	90,00
Enfermo 2 (6984)	0,41	44,7	111,75	50,0	125,00
Enfermo 3 (2793)	0,34	16,2	47,65	40,7	119,71
Enfermo 4 (8431)	0,37	59,1	159,73	47,3	127,84

Tabla 1A

ID	Ferritina (μg/l)	Ferr/Linf (μg/l)/(10 ³ cell/μl)	TOS (μmol/l)	TOS/Linf (μmol/l)/(10 ³ cell/μl)
Valor medio obtenido de los 4 sujetos sanos	15,55 (4,02)	17,78 (3,47)	34,58 (5,57)	40,77 (11,91)
Valor medio obtenido de los 4 sujetos enfermos	37,55 (18,49)	95,19 (51,08)*	45,53 (4,02)*	115,64 (17,42)*

Desviación típica (SD) indicada entre paréntesis para cada valor *p<0.05

5

Tabla 1B.

En la Tablas 1A y 1B se aprecian valores significativamente más elevados de ferritina/linfocitos y de TOS/linfocitos en las muestras analizadas de perros enfermos en comparación con las muestras analizadas de perros sanos. Además, se aprecia que, en el caso de la ferritina, sólo cuando se corrige el valor con el número de células mononucleares en la muestra, aparecen diferencias significativas entre animales sanos y enfermos.

10

Los perros sanos tuvieron unos niveles de anticuerpos indetectables, mientras que los enfermos tuvieron unos niveles de anticuerpos superiores a 1:360, que indicaría un predominio de la inmunidad humoral capaz de producir unos niveles muy altos de anticuerpos y un descenso de la inmunidad celular. Así los niveles de ferritina/linfocitos y TOS/linfocitos altos se pueden asociar a (1) una alteración del sistema inmune en el que hay

15

una predominancia de la inmunidad humoral con producción de anticuerpos, y también a (2) aparición de signos clínicos en los animales.

Se compararon además los valores obtenidos para los analitos CUPRAC, FRAP, TEA, catalasa y mieloperoxidasa en dos perros sanos y dos con leishmania, siguiendo el método *in vitro* de la invención.

En este caso los valores de capacidad antioxidante reductora de ion cúprico (CUPRAC), estatus antioxidante del hierro (FRAP) y esterasa total (TEA) se obtuvieron por métodos espectrofotométricos previamente descritos en Serum antioxidant capacity and oxidative damage in clinical and subclinical canine ehrlichiosis. Rubio CP, Yilmaz Z, Martínez-Subiela S, Kocaturk M, Hernández-Ruiz J, Yalcin E, Tvarijonaviciute A, Escribano D, Ceron JJ. Res Vet Sci. 2017 Dec; 115:301-306.

Por otro lado, los valores de catalasa también se obtuvieron en este caso por un método espectrofotométrico previamente descrito en Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense, and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. Goranov NV. Vet Clin Pathol. 2007 Jun;36(2):192-5.

Finalmente, los valores de mieloperoxidasa se obtuvieron también por un método espectrofotométrico previamente descrito en Evaluation of serum myeloperoxidase concentration in dogs with heart failure due to chronic mitral valvular insufficiency. Park JI, Suh SI, Hyun C. Can J Vet Res. 2017 Jan;81(1):37-40.

Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3:

ID	CUPRA (mmol/l)	CUPRA/Linf. (mmol/l)/(10 ³ cell/μL)	FRAP (mmol/l)	FRAP/Linf. (mmol/l)/(10 ³ cell/μl)	TEA (UI/l)	TEA/Linf. (UI/l)/(10 ³ cell/μl)
Sano 1 (9358)	0,0425	0,0383	0,0148	0,0133	58,0	52,25
Sano 2 (8349)	0,0374	0,0277	0,0172	0,0127	61,5	45,56
Enfermo 1 (4196)	0,0444	0,3415	0,0185	0,1423	73,7	566,92
Enfermo 3 (4175)	0,0487	0,3479	0,0161	0,1150	76,3	545,00

Tabla 2

ID	Catalasa (UI/l)	Catalasa/Linf. (UI/l)/(10 ³ cell/ μ l)	Mieloperoxidasa (mmol/l)	Mieloperoxidasa/Linf. (mmol/l)/(10 ³ cell/ μ l)
Sano 1 (9358)	0,067	0,0604	0,42	0,378
Sano 2 (8349)	0,058	0,0430	0,53	0,393
Enfermo 1 (4196)	0,072	0,5538	1,03	7,923
Enfermo 3 (4175)	0,074	0,5286	0,85	6,071

Tabla 3

Se puede apreciar en ambas tablas mayores valores de estos analitos en los perros enfermos en comparación a los valores obtenidos en perros sanos, en muchos casos el aumento es del orden de 10 veces más, cuando se comparan los valores obtenidos relativos al número de células mononucleares de la muestra analizada, en perros enfermos en comparación a perros sanos.

Ejemplo 2: Influencia de la congelación en la liberación de analitos en células mononucleares.

Se emplearon muestras de dos perros enfermos de leishmania diagnosticados del ejemplo 1 y se llevó a cabo el método *in vitro* de la invención. De todas las muestras se hicieron 2 alícuotas:

-en una alícuota se midieron los valores de ferritina usando las células mononucleares separadas sin congelar y tras 1 hora después de su separación.

-en la otra se midieron los valores de ferritina tras congelar las células mononucleares separadas de acuerdo con el método *in vitro* descrito en la invención, 1 hora a -20°C.

Los valores de ferritina se determinaron como se ha indicado previamente en el ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la Tabla 4:

ID	Condiciones		Linf ($10^3\text{cel}/\mu\text{l}$)	FRR ($\mu\text{g}/\text{l}$)	FRR/Linf ($\mu\text{g}/\text{l})/(10^3\text{cel}/\mu\text{L})$
	Temperatura	Tiempo			
Caso 1 (8145)	Ambiente	1h	1,43	5,8	4,06
	-20°C	1h		73,6	51,47
Caso 2 (3254)	Ambiente	1h	0,39	10,3	26,41
	-20°C	1h		24,7	63,33

Tabla 4

Se puede apreciar en los valores recogidos en la Tabla 4 que la congelación a -20°C produce una liberación de ferritina al medio mucho más importante que cuando las células mononucleares no se congelan.

Ejemplo 3: Efecto de diferentes tiempos de congelación a -20°C en los valores de los analitos obtenidos.

En este ejemplo se utilizaron 2 perros enfermos de leishmaniosis del ejemplo 1. Siguiendo el método in vitro de evaluación de la inmunidad celular de la presente invención se determinó tanto el contenido total de ferritina y TOS como se ha descrito en el ejemplo 1, como el contenido de dichos marcadores relativo al número de linfocitos de la muestra, utilizando 30, 60 y 90 min de congelación.

Los resultados se muestran en la **Tabla 5**:

ID	Tiempo de congelación (min)	Linfocitos ($10^3\text{ cell}/\mu\text{L}$)	FRR. ($\mu\text{g}/\text{l}$)	FRR. /Linf. ($\mu\text{g}/\text{l})/(10^3\text{cell}/\mu\text{l})$	TOS ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	TOS/Linf. ($\mu\text{mol}/\text{l})/(10^3\text{ cell}/\mu\text{l})$
Enfermo 1 (4787)	30	0,40	38,8	97,00	49,5	123,75
	60		44,7	111,75	50,0	125,00
	90		50,5	126,25	54,4	136,00
Enfermo 2 (3689)	30	0,33	54,6	165,45	43,7	132,42
	60		50,5	153,03	45,1	136,67
	90		72,0	218,18	43,1	130,61

Tabla 5

Se puede apreciar que, en general, hay un aumento en los valores de los analitos cuando se aumentan los tiempos de congelación.

Ejemplo 4: Prueba de estabilidad.

- 5 Se analizó ferritina y TOS por los métodos anteriormente descritos en las muestras de dos de los animales sanos y dos de los animales enfermos directamente tras la realización del método *in vitro* de la invención, y posteriormente tras dejar las muestras del líquido sobrenadante del paso (v), 24 horas a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la **Tabla 6**:

10

ID	Procesamiento	Linfocitos (10 ³ cell/μl)	Ferritina (μg/l)	Ferr/Linf (μg/l)/(10 ³ cell/μl)	TOS (μmol/l)	TOS/Linf (μmol/l)/(10 ³ cell/μl)
Sano 1 (8854)	1 h a -20 °C	1,11	19,9	17,93	38,4	34,59
	+ 24 h a temp. amb.		18,6	16,76	32,5	29,28
Sano 2 (9315)	1 h a -20 °C	1,35	17,9	13,26	40,3	29,85
	+ 24 h a temp. amb.		19,2	14,22	37,9	28,07
Enfermo 1 (2668)	1 h a -20 °C	0,49	30,2	61,63	44,1	90,00
	+ 24 h a temp. amb.		28,5	58,16	44,8	91,43
Enfermo 2 (7295)	1 h a -20 °C	0.35	32.0	91.43	28.9	82.57
	+ 24 h a temp. amb.		31.3	89.43	28.4	84.14

Tabla 6

Se aprecia que tanto los valores obtenidos de ferritina como los obtenidos de TOS son prácticamente estables tanto si se miden directamente después de aislar el sobrenadante en el paso (v) del método de la invención, como si se miden en el sobrenadante 24 horas después conservándolo a temperatura ambiente.

15

Ejemplo 5: comparación entre velocidades de centrifugación del paso (iv).

Se tomó una muestra de sangre entera de un perro enfermo con leishmaniosis y se realizaron llevó a cabo el método de la invención, determinando en dicha muestra los valores de ferritina (FRR) y TOS por los métodos descritos en el ejemplo 1.

5 Los resultados se muestran en la **Tabla 7**:

ID	Condiciones		Linf (10 ³ cel/μl)	FRR (μg/l)	FRR/Linf. (μg/l)/(10 ³ cel/μl)	TOS (μmol/l)	TOS/Linf (μmol/l)/(10 ³ cel/μl)
	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)					
Caso 1 (6182)	15000	5	0,72	36,4	50,56	46	63,89
	1700	5		38,1	52,92	47,1	65,42

Tabla 7

Se aprecia que no hay diferencias en los valores de los analitos al cambiar la velocidad de centrifugación.

10

BIBLIOGRAFÍA:

- Brelaz de Castro *et al.*, Cellular Immunology 279 (2012), 180-186
- Arce Fonseca *et al.*, Veterinary Research (2013), 44:15
- 15 – Burluson *et al.*, Immunology Testing, pág. 195-205, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 58, Chapter 14, Ed. Humana Press (2010)
- Erel *et al.*, Clin Biochem 38 (2005), 1103-1111
- Rubio CP, Yilmaz Z, *et al.*, Res Vet Sci. 2017 Dec; 115:301-306.
- Goranov NV *et al.* Vet Clin Pathol. 2007 Jun;36(2):192-5.
- 20 – Park JI *et al.* Can J Vet Res. 2017 Jan;81(1):37-40.

REIVINDICACIONES

- 1- Método *in vitro* para evaluar la inmunidad celular a partir de una muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares de un animal o de un ser humano, donde dicho método comprende:
- 5 i. separar las células mononucleares de la muestra de fluido biológico;
- ii. suspender las células mononucleares separadas en una solución salina;
- iii. cuantificar las células mononucleares presentes en la solución salina de células mononucleares obtenida en el paso (ii);
- iv. congelar la solución salina de células mononucleares;
- 10 v. descongelar la solución salina de células mononucleares y realizar a continuación una centrifugación;
- vi. recoger el líquido sobrenadante resultante de la centrifugación del paso (v); y
- vii. determinar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo en el líquido sobrenadante recogido en el paso (vi)
- 15 viii. comparar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo determinado el paso (viii) con el contenido medio de referencia del mismo analito que se obtiene al reproducir dicho método en las mismas condiciones a partir de al menos dos muestras del mismo tipo de fluido biológico que comprenden células mononucleares de animales o de seres
- 20 humanos sanos.
- 2- Método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, donde el paso (iv) se realiza a una temperatura de -20°C.
- 3- Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el paso (iv) se realiza durante al menos 1 hora.
- 25 4- Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde en el paso (vii) se determina el contenido total y/o el contenido en relación con el número de células mononucleares cuantificado en el paso (iii), de al menos un analito indicador de inflamación y/o estrés oxidativo.
- 30 5- Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el al menos un analito indicador de inflamación y/o estrés oxidativo se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en ferritina, oxidantes totales (TOS), mieloperoxidasa, proteína C reactiva, haptoglobina, capacidad antioxidante reductora de

ion cúprico (CUPRAC), paraoxonasa-1 (PON1), interleuquinas, antioxidantes totales (TAC), estatus antioxidante del hierro (FRAP), esterasa total (TEA), catalasa, nitrito, tiol u óxido nítrico; o combinaciones de los mismos.

- 5 6- Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde en el paso (vii) se determina el contenido de al menos ferritina y de oxidantes totales (TOS).
- 7- Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el paso (iii) se realiza en un analizador de hematología no basado en la tecnología de citometría de flujo.
- 10 8- Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el paso (i) se realiza mediante una separación con gradiente de densidad.
- 9- Kit de evaluación de inmunidad celular a partir de una muestra de fluido biológico que comprende células mononucleares de un animal o de un ser humano, que comprende:
- 15 a. un primer soporte que comprende una solución separadora de células mononucleares mediante gradiente de densidad;
- b. un segundo soporte que comprende una solución salina;
- c. un tercer soporte adecuado para cuantificar un analito en un analizador de bioquímica;
- donde dicho kit comprende además instrucciones, en el que dichas instrucciones comprenden:
- 20 i. añadir sin mezclar la muestra de fluido biológico sobre la solución separadora de células mononucleares del primer soporte y someterla a una centrifugación;
- ii. recoger las células mononucleares de la muestra de fluido biológico de la interfase existente entre el sobrenadante y el pellet formados en la centrifugación, y suspenderlas en la solución salina del segundo soporte;
- 25 iii. cuantificar las células mononucleares presentes en la solución salina de células mononucleares del segundo soporte obtenida en el paso (ii);
- iv. congelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte;
- v. descongelar la solución salina de células mononucleares del segundo soporte dejando reposar dicho soporte a temperatura ambiente y realizar a
- 30 continuación una centrifugación;
- vi. recoger el líquido sobrenadante resultante de la centrifugación del paso (v) y depositarlo en el tercer soporte; y

- vii. determinar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo en el líquido sobrenadante recogido en el paso (vi)
- viii. comparar el contenido de al menos un analito indicador de inflamación y/o indicador de estrés oxidativo determinado el paso (viii) con el contenido medio de referencia del mismo analito que se obtiene al reproducir dicho método a partir de al menos dos muestras de fluido biológico que comprenden células mononucleares de animales o de seres humanos sanos.
- 5
10. Kit de acuerdo con la reivindicación 9 donde las instrucciones comprenden que la congelación en el paso (iv) se realiza a una temperatura de -20°C.
- 10 11. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde las instrucciones comprenden que la congelación en el paso (iv) se realiza durante al menos 1 hora.
12. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde las instrucciones comprenden que el paso (vii) comprende determinar el contenido total y/o el contenido en relación con el número de células mononucleares cuantificado en el paso (iii), de al menos un analito indicador de inflamación y/o estrés oxidativo.
- 15
13. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde las instrucciones comprenden que el al menos un analito indicador de inflamación y/o estrés oxidativo se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en ferritina, , oxidantes totales (TOS), mieloperoxidasa, proteína C reactiva, haptoglobina, capacidad antioxidante reductora de ion cúprico (CUPRAC), paraoxonasa-1 (PON1), interleuquinas, antioxidantes totales (TAC), estatus antioxidante del hierro (FRAP), esterasa total (TEA), catalasa, nitrito, tiol u óxido nítrico.
- 20
14. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde las instrucciones comprenden que en el paso (vii) se determina el contenido de al menos ferritina y los oxidantes totales (TOS).
- 25
15. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde las instrucciones comprenden que el paso (iii) se realiza en un analizador de hematología no basado en la tecnología de citometría de flujo.