

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 706**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09718993 .0**
96 Fecha de presentación: **30.01.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2255196**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN Y/O CUANTIFICACIÓN Y/O IDENTIFICACIÓN IN VITRO DE COMPUESTOS INFECCIOSOS EN UN MATERIAL BIOLÓGICO.**

30 Prioridad:
01.02.2008 FR 0800553

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2012

73 Titular/es:
Apoh Technologies SA
94 allée des Fauvettes
34280 La Grande Motte, FR

72 Inventor/es:
STEFAS, Ilias

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 376 706 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

Procedimiento de detección y/o cuantificación y/o identificación *in vitro* de compuestos infecciosos en un material biológico.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o cuantificación y/o identificación *in vitro* de compuestos infecciosos en un material biológico.

10 En la presente solicitud de patente, se entiende por "material biológico" un tejido biológico, una preparación o un extracto procedente de tejido biológico, líquido o sólido, o un medio, natural o no, susceptible de contener compuestos infecciosos, por ejemplo un agua de vertido o un agua de lavado de frutas y legumbres. Dicho material puede ser también una mezcla de al menos dos materiales, tales como los definidos antes; por consiguiente puede bien ser
10 preparado, principalmente, a partir de tejidos, órganos, heces o líquidos biológicos de un enfermo que padece una infección, o bien ser obtenido a partir de cultivos "*in vitro*"; dicho material biológico también puede ser suero, plasma, orina, líquido cefalo-raquídeo, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido seminal o líquido ascítico.

15 En la presente solicitud de patente, se entiende por compuestos infecciosos, en lo sucesivo denominados de modo genérico abreviadamente "CI", tanto los compuestos, en particular proteínicos, constitutivos de un agente infeccioso, como las estructuras que comprenden compuestos infecciosos. Estas estructuras son, principalmente, o bien agentes infecciosos endógenos o exógenos, completos o incompletos, su metabolito o incluso combinaciones que contienen los compuestos constitutivos de estos agentes infecciosos, combinaciones que presentan ciertas propiedades de dichos agentes infecciosos, principalmente la propiedad de ser detectado por ciertos anticuerpos específicos de los compuestos infecciosos; los CI también pueden ser compuestos específicamente inducidos en el organismo por
20 los CI definidos precedentemente, o por la expresión de genes que se expresan de modo anómalo. Entre los CI se pueden citar, por ejemplo, virus, bacterias, hongos, micoplasmas, parásitos y células animales anómalas.

25 Ya se ha descrito una glicoproteína plasmática denominada β 2-glicoproteína I, o incluso abreviadamente " β 2GPI"; la secuencia de esta glicoproteína humana ha sido indicada principalmente en los artículos de J. LOZIER et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 81, pp. 3640-3644 (julio 1984) y de T. KRISTENSEN et al., *FEBS Letters*, Vol. 289, pp.183-186 (1991). Se ha comprobado que esta proteína β 2GPI presenta un polimorfismo: la denominación β 2GPI será considerada en lo sucesivo como genérica para todas las formas.

30 En la solicitud de patente internacional WO 94/18569, se ha indicado que ciertos compuestos infecciosos, en particular proteínicos, se fijaban sobre la forma de β 2GPI que había sido descrita en la patente francesa 2.701.263. En el documento WO 94/18569, se ha propuesto un procedimiento de detección y/o valoración de compuestos virales en el cual se fijan los compuestos infecciosos virales sobre la forma de β 2GPI utilizada; se añade pues esta forma de β 2GPI sobre compuestos infecciosos virales contenidos en un material biológico, de modo que se separen los compuestos virales así capturados para a continuación detectarlos y valorarlos. En la patente europea EP 775315, se ha descrito la formación de un complejo entre un compuesto infeccioso, en particular proteínico, y una forma cualquiera de β 2GPI; el compuesto infeccioso podía ser, principalmente una bacteria. De dichos documentos se deduce que la
35 β 2GPI es susceptible de fijarse sobre un soporte sólido plano, tal como los fondos de un pocillo de una placa de microtitulación, y que la β 2GPI así atrapada sobre dicho soporte sólido plano, es susceptible de fijar los compuestos infecciosos (CI) presentes en las muestras clínicas, biológicas o medioambientales a concentraciones muy bajas. Se sabe, además, que dichas muestras pueden contener sustancias que inhiban, al menos parcialmente, la detección de agentes patógenos, sustancias que, por consiguiente, pueden disminuir la sensibilidad de la detección. Por tanto es importante poder capturar y concentrar estos agentes patógenos para eliminar las sustancias que inhiben su
40 detección.

45 Los estudios de la sociedad solicitante han mostrado que la fijación de la β 2GPI sobre el fondo de los pocillos de placas de titulación, se produce gracias a una conformación particular de la β 2GPI, conformación que permitía anteriormente la formación de un complejo de la β 2GPI con un compuesto infeccioso. La literatura científica había señalado por otra parte que la conformación de la β 2GPI variaba en su fijación sobre una superficie sólida (Matsuura et al., *J. Exp. Med.* 179, pp. 457-462 (1994)). Ya se había descrito (A. IWATA et al., *Biol. Pharm. Bull.* 26(8), pp. 1065-1069 (2003)) un procedimiento de concentración de virus que utiliza microbolas magnéticas sulfonadas sobre las cuales quedaban atrapados los virus, obteniéndose la concentración de los virus gracias al hecho de que las microbolas eran magnéticas y podían ser separadas del medio infeccioso por acción de un campo magnético. Desafortunadamente el resultado de esta técnica era esencialmente función del atrapamiento de los virus sobre las microbolas. Este documento explica de modo detallado que ciertos virus carentes de envoltorio no se fijan sobre las microbolas de polietilimina y que es necesario utilizar microbolas sulfonadas para concentrar ciertos virus. Además, para ciertos virus, era necesario añadir al medio cationes divalentes, tales como Zn^{2+} o Cu^{2+} . De esta constatación se deduce que, según la naturaleza del virus, el polímero que constituye las microbolas debe ser diferente, injertado
55 o no, y que los iones divalentes son necesarios o no; por consiguiente las bolas deben ser preparadas caso por caso en función del virus que se ha de concentrar. Las mismas constataciones resultan del documento de E. UCHIDA et al., *Journal of Virological Methods*, 143, pp. 95-103 (2007), que se refiere a la concentración de los virus de las hepatitis A, B, C humanas. En presencia de una muestra que contiene un virus no identificado que hay que detectar, no era pues posible determinar que naturaleza de microbolas era susceptible de dar lugar a un atrapamiento del

virus de interés.

En consecuencia, teniendo en cuenta los inconvenientes antes mencionados, un experto en la técnica habría tenido que decidirse a buscar las condiciones medioambientales favorables para que las microbolas pudieran atrapar compuestos infecciosos cualquiera que fuera su naturaleza o su identidad. Esto es por otra parte los pasos seguidos por UCHIDA en su artículo antes citado; dicho autor ha descrito las condiciones particularmente favorables para la captura directa de los virus VHA, VHB y VHC. La sociedad solicitante, sin embargo, ha abordado estos pasos proponiendo, según la presente invención, interponer una molécula de β 2GPI, entre una microbola y un compuesto infeccioso (CI) que ha de ser fijado encima. El estado de la técnica ha permitido determinar la naturaleza de los soportes sólidos que permiten un buen atrapamiento de la proteína β 2GPI; la fijación de la β 2GPI sobre una microbola se efectúa entonces sin que el polímero de la microbola tenga que ser modificado en función del compuesto infeccioso que se ha de fijar ulteriormente. Y, además, se ha comprobado que la fijación de la β 2GPI sobre la microbola no perturbaba el atrapamiento del compuesto infeccioso sobre la β 2GPI; ahora bien, este último punto era totalmente inesperado porque no se podía prever que la conformación de la β 2GPI fijada sobre una microbola, permitiera el atrapamiento de un agente patógeno sobre la glicoproteína. Por otra parte y de modo complementario, un elemento disuasorio para conducir a la invención provenía del hecho que se sabía que la β 2GPI tenía tendencia a autopolimerizarse (véase: *Thrombosis Research*, 108, pp. 175-180 (2003)), lo que tenía el riesgo de implicar una aglutinación de las microbolas portadoras de β 2GPI, aglutinación que, naturalmente, haría impensable la fijación de agentes patógenos sobre las moléculas de β 2GPI.

Finalmente, se ha comprobado, según la invención, que el atrapamiento de los compuestos infecciosos sobre las microbolas cargadas de β 2GPI permitía, en ciertos casos, por contacto directo de las microbolas cargadas de β 2GPI y del CI con un medio apropiado, detectar, cuantificar o identificar los CI atrapados. En el caso de los virus, dicho medio es un cultivo de células susceptibles de ser infectadas por los virus capturados por las microbolas.

Según otro aspecto de la invención, la sociedad solicitante también ha buscado, paralelamente, asegurar un buen atrapamiento de los CI sobre las microbolas cargadas con β 2GPI, actuando sobre el medioambiente donde se efectúa el atrapamiento; y ha comprobado que este objeto era alcanzable cuando se añadía al medio de atrapamiento iones de un metal oxidante, cualquiera que fuera la naturaleza de los CI, principalmente virus o bacterias. Entre estos metales, figura el Cu^{2+} , pero este efecto no es debido al hecho de que el Cu sea divalente (contrariamente a lo que se podría pensar en el estudio de la publicación de IWATA antes citada) porque IWATA menciona que obtiene un resultado satisfactorio con Zn^{2+} o Cu^{2+} , mientras que la sociedad solicitante ha comprobado que, para la puesta en práctica de la invención, el Zn no da resultados significativos. Por otra parte se había indicado ya que la presencia de iones Zn o Fe era desfavorable para el atrapamiento de los virus sobre la β 2GPI (STEFAS et al., *Hepatology*, 33(1), páginas 207-217 (2001)); ahora bien la presencia de elementos magnéticos en las microbolas puede generar una difusión desfavorable de los iones hierro en el medio de suspensión de las microbolas. La sociedad solicitante no ha comprobado ningún efecto notable desfavorable para la fijación de los CI sobre la β 2GPI cuando se asegura la presencia de iones oxidantes en el medio.

En consecuencia, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de detección y/o cuantificación y/o identificación *in vitro* de compuestos infecciosos presentes en un medio fluido M que constituye un material biológico, procedimiento en el cual, de modo conocido, se prepara una suspensión, en un medio líquido de suspensión, de microbolas delimitadas por una superficie externa constituida por un material polímero sólido susceptible de fijar proteínas, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a) se asegura una carga de las microbolas de la suspensión con proteínas β 2GPI por acoplamiento con una cantidad suficiente de proteínas β 2GPI, bien sea de forma pasiva en un medio de suspensión o bien sea utilizando un protocolo de unión química conocido;
- b) se ponen en contacto, en un recipiente, dichas microbolas cargadas con proteínas β 2GPI con el medio fluido M añadiendo iones de al menos un metal oxidante, en condiciones apropiadas para asegurar una fijación suficiente de los compuestos infecciosos sobre las proteínas β 2GPI llevadas por las microbolas;
- c) se separan las microbolas así preparadas de su medio de suspensión, se evacua dicho medio de suspensión del contenedor para obtener, eventualmente después de un lavado con un tampón, un residuo con una fuerte concentración de compuestos infecciosos;
- d) y se detectan y/o cuantifican y/o identifican los compuestos infecciosos a partir del residuo concentrado así obtenido.

Preferentemente, los iones del metal oxidante que, en la etapa b) del procedimiento según la invención, se añaden al medio M, son iones cúpricos, estando la concentración de dichos iones cúpricos en dicho medio comprendida, después de dicha adición, entre 1 y 100 mM.

Ventajosamente, la etapa d) del procedimiento según la invención antes definido se realiza por un medio tomado del grupo formado por infecciosidad, una reacción enzimática específica, un trazador fluorescente o radiomarcado, una detección de ácidos nucleicos específicos por hibridación con una sonda marcada, una reacción PCR o RT-PCR, una

valoración, un recuento, una visualización, un procedimiento óptico o una microscopía electrónica o no.

Los compuestos infecciosos (CI) pueden ser principalmente bacterias.

En el caso de que los CI sean bacterias, se las puede detectar y/o cuantificar y/o identificar por lectura de la densidad óptica, por ATP-metría o por PCR («reacción en cadena de la polimerasa»).

5 En el caso de que los CI sean virus, se extraen por lisis, a partir del residuo concentrado obtenido al final de la etapa c) del procedimiento los ácidos nucleicos de los CI de interés, se amplifican por PCR (o RT-PCR si los virus de interés son retrovirus) utilizando los cebadores apropiados para dichos CI de interés y se practica una visualización sobre gel de los ácidos nucleicos eventualmente obtenidos para definir la presencia o ausencia de los CI de interés y/o para cuantificar la carga de dichos CI de interés en el medio M. Ventajosamente, para detectar y/o identificar los virus de interés fijados sobre las microbolas obtenidas según la etapa c) del procedimiento según la invención, se vuelve a poner en suspensión el residuo, se ponen en contacto sus microbolas con células sensibles al virus de interés, se cultivan dichas células y se observa la eventual infección de las células por los virus de interés. Para detectar una infección de células, se puede observar, por ejemplo, el efecto citopatológico del compuesto infeccioso después de una coloración apropiada de las células o incluso observar la inmunofluorescencia después de la fijación de las células y reacción con anticuerpos fluorescentes, que reconocen las proteínas correspondientes a la presencia de los compuestos infecciosos.

Preferentemente, el material sólido constitutivo de la superficie externa de las microbolas se elige del grupo formado por las materias plásticas y los elastómeros, llevando o no dicho material grupos reactivos injertados sobre la superficie externa de las microbolas para asegurar un enlace químico con las proteínas β 2GPI; las microbolas pueden tener ventajosamente una forma sensiblemente esférica y un diámetro medio comprendido entre 1 y 100.000 nm. Según una primera variante, las microbolas se separan de su medio de suspensión por centrifugación; pero según una segunda variante preferida, se eligen microbolas que tengan un núcleo formado por una (o varias) partícula(s) de material magnético para permitir su separación del medio de suspensión gracias a un campo magnético. Dichas microbolas magnéticas están disponibles en el comercio: por ejemplo, están constituidas por un núcleo magnético recubierto por una matriz polímera de poliestireno. El campo magnético que permite la separación de las microbolas de su medio de suspensión, puede ser creado por un simple imán permanente que se aproxima al recipiente para realizar la etapa c) del procedimiento según la invención.

El único límite concerniente a la elección del material constitutivo de las microbolas es poder acoplarle la β 2GPI: por ejemplo, se pueden emplear microbolas magnéticas correspondientes a la denominación comercial "*Estapor® microsphères superparamagnétiques*" vendidas por la sociedad "MERCK". Como se ha indicado precedentemente, el acoplamiento de la β 2GPI sobre las microbolas se puede realizar bien de forma pasiva o bien utilizando un protocolo de acoplamiento químico. Para realizar un acoplamiento pasivo con microbolas, principalmente las microbolas "Estapor®" antes citadas, las microbolas se ponen ventajosamente en suspensión en un tampón que contiene la β 2GPI, a un pH comprendido entre 3,5 y 10,5 y mejor entre 5,5 y 9,5. El tampón utilizado forma parte de los tampones usuales en biología y, principalmente, puede ser un tampón de acetato, fosfato, borato, Tris. La mezcla microbola/ β 2GPI se incuba de preferencia a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C durante un tiempo comprendido entre 10 minutos y 24 horas con agitación, de preferencia una agitación horizontal suave y constante. A continuación, las microbolas se separan magnéticamente o se centrifugan y se elimina el líquido sobrenadante. El sedimento que contiene las microbolas se pone en suspensión en un tampón de conservación, que es preferentemente el mismo que el utilizado ulteriormente para el acoplamiento, teniendo este tampón un pH comprendido entre 6 y 9. Preferentemente, se efectúa la carga de las microbolas con las proteínas β 2GPI poniéndolas en un medio líquido de suspensión que contiene, en solución acuosa, de 10^{-6} a 100 mg de β 2GPI por gramo de peso seco de microbolas, estando entonces la concentración en β 2GPI del medio comprendida entre 10^{-5} y 10 μ g/ μ l, y agitando la suspensión así constituida durante 15 a 60 minutos a una temperatura comprendida entre 30°C y 45°C.

45 La muestra que contiene el CI se pone en contacto con las microbolas cargadas, bien directamente, bien después de su dilución en un tampón, cuyo pH está comprendido entre 5 y 9, mejor entre 5,6 y 8. El complejo, que se forma entre la β 2GPI y el CI, se incuba ventajosamente a continuación durante un período de tiempo comprendido entre 5 minutos y 24 horas, preferentemente, entre 30 minutos y 2 horas, a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C, preferentemente a 37°C. Después de la incubación, la muestra que no ha reaccionado con la β 2GPI fijada sobre las microbolas, se elimina por centrifugación o imantación de las microbolas. Las microbolas así aisladas se pueden utilizar para la detección y/o cuantificación y/o identificación del CI. La separación y/o valoración y/o cuantificación del CI unido al soporte por la β 2GPI se puede realizar por cualquier medio conocido, tal como infecciosidad, una reacción enzimática específica, un trazador fluorescente o radiomarcado, la detección del ácido nucleico específico por hibridación con una sonda marcada, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una valoración, un recuento, una visualización, un procedimiento óptico o una microscopía electrónica o no.

Para mejor comprender el objeto de la invención, se describe a continuación, a modo de ejemplos puramente ilustrativos y no limitativos, diversos modos de realización.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Fijación de una bacteria en medio cúprico sobre microbolas cargadas con β2GPI.

En un primer momento, la bacteria que se utilizó era una cepa de *Escherichia Coli* (E. Coli) proporcionada por el *Centre de conservation de produits agricoles* (CPA). Un pre-cultivo se incubó a 37°C durante 16 horas en medio LB (Luria Bertani) que tenía la composición siguiente:

5

Bacto-triptona	10	g
Extracto de levadura.....	5	g
NaCl	10	g
pH	7,5	
Agua csp.....	1000	g

10

Este pre-cultivo se utilizó inmediatamente o se conservó a 4,5°C.

Las microbolas destinadas a fijar las bacterias que se utilizan en este ejemplo son microbolas magnéticas vendidas por la Sociedad MERCK bajo la denominación "*Estapor® microsphères superparamagnétiques*" que tienen un diámetro comprendido entre 0,300 y 0,500 μm.

15

Estas microbolas se ponen en suspensión en un tampón a un pH de 6,0 que contiene la β2GPI. La concentración de β2GPI en este tampón de acoplamiento es 100 μg/ml; las microbolas se incuban en el tampón bajo agitación suave y constante a una temperatura de 25°C durante 3 horas. Las microbolas se centrifugan a continuación a 1500 revoluciones/minuto y se elimina el líquido sobrenadante; el sedimento de centrifugación se pone en suspensión en el mismo tampón que el utilizado para el acoplamiento ulterior de la β2GPI, lo que forma la suspensión de microbolas cargadas con β2GPI que se desea analizar.

20

10⁵ bacterias del pre-cultivo se ponen en suspensión bien sea en un tampón Tris 50 mM (pH 7,6), bien sea en un tampón PBS (véase formulación más adelante), bien sea en un tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 5,6 con HCl 10 mM), en presencia o ausencia de CuSO₄ 2 mM, y bien sea en un medio LB; las diferentes suspensiones de E. Coli se cultivan en tubos para hemólisis de 1 ml con una cantidad de microbolas constante (10 μl). Los tubos se incuban a 37°C durante 60 minutos, con agitación horizontal. En cada tubo, se separan a continuación las microbolas de la fase líquida por medio de un imán permanente colocado exteriormente contra la pared del tubo y se evacúa el líquido sobrenadante. Las microbolas se lavan a continuación dos veces con PBS estéril que tiene la formulación siguiente:

25

NaCl	80	g
KCl	74,562g	
KH ₂ PO ₂	2,4	g
Na ₂ HPO ₄ /2H ₂ O	29	g
Agua csp	1000	g

30

35 La presencia de bacterias se evalúa por PCR. La tabla I resume los resultados obtenidos :

Tabla 1

Tampón	PCR
Tris	+
PBS	+
Acetato Na	+
Acetato Na/Cu ²⁺	++
LB	+

El DNA bacteriano se extrae a partir de las bacterias que han sido capturadas por las microbolas; las bacterias se

lisan añadiendo a las microbolas 100 µl de "Chelex 30 %". La mezcla se incuba durante 10 minutos a 95°C; a continuación se efectúa una centrifugación durante 10 minutos a 10.000 revoluciones/minuto. El líquido sobrenadante que contiene el DNA se conserva a -20°C.

5 A 3 µl del DNA extraído se añaden 47 µl de la solución de amplificación (*AquaPure Genomic DNA Isolation KIT*); las concentraciones finales son las siguientes:

- 5 µl: dXTP 200 mM
 - 10 µl: Tampón 5X
 - 5 µl: MgCl₂ 2mM
 - 1 µl de cada cebador: (cebador diluido a 200 mL):
- 10 27: GTGCTGCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG (sentido)
 1492: CACGGATCCTACGGGTACCTTGTTACGACTT (antisentido)
- 1 µl : Taq polimerasa 5 u/4 µL
 - Agua PPI csp 50 µL

15 Después de homogeneización, las mezclas reaccionantes se colocan en un termociclador "Eppendorf" y se someten al programa siguiente:

94°C: 1 minuto	}	35 ciclos
60°C: 1 minuto		
72°C: 2 minutos		
72°C: 10 minutos		

20 Los DNA se mantienen a continuación a 10°C. La migración se hace sobre un gel de agarosa al 2 % en tampón PBE 0,5X que contiene bromuro de etidio. El gel se observa luego bajo luz UV. Los resultados de la PCR indican la presencia de una bacteria: se constata una fuerte señal positiva. La identificación de la bacteria se realiza a continuación por secuenciación de modo conocido. La PCR muestra la presencia de DNA bacteriano sobre las microbolas, cualquiera que sea el tampón utilizado con una señal superior para el caso del tampón de acetato en presencia de Cu²⁺.

25

En un segundo momento, se llevaron a cabo igualmente ensayos análogos con las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* y se obtuvo el mismo tipo de resultados.

EJEMPLO 2: Fijación en medio cúprico del virus del herpes OsHV-1 sobre microbolas cargadas con β2GPI.

30 Este virus existe en las ostras. Se realiza un triturado de ostras del cual se extrae el DNA por PCR por medio de microbolas magnéticas cargadas con β2GPI. Estas microbolas cargadas se preparan como se indica en el Ejemplo 1.

35 100 mg de ostras jóvenes se trituran en 500 µL de agua de calidad milli-Q. El triturado (50 µl) se diluyó en dos tampones diferentes, a saber, un tampón de PBS (pH = 7-7,4) (composición idéntica a la del ejemplo 1) y un tampón de acetato/Cu²⁺ (pH = 5,6) que tiene la composición definida en el ejemplo 1.

40 Se añaden a 500 µL de lo que constituye así dos medios fluidos M, cantidades de microbolas cargadas de 10, 20 o 50 µL. Las bolas se incuban a continuación 37°C durante 30 minutos y se lavan 2 veces con el tampón PBS. El DNA se extrae finalmente añadiendo 100 µl de «Chelex 30%». Se deja incubar durante 10 minutos a 95°C. Los tubos se someten a una centrifugación a 10.000 revoluciones/minutos durante 10 minutos y se conserva el líquido sobrenadante que contiene el DNA.

A continuación se practica una PCR sobre 1 µL del DNA extraído. Se añaden 19 µL de una solución de amplificación (kit *PCR Hot Master Taq Eppendorf*) con las concentraciones finales siguientes:

Tampón	1X
--------	----

ES 2 376 706 T3

dNTP	250 μ M
Cebadores C2 y C6	0,2 μ M de cada uno
Taq Polimerasa	1,5 U

Los cebadores C2 y C6 son los siguientes:

- 5 C2 (sentido) = CTCTTTACCATGAAGATACCCACC
C6 (antisentido) = GTGCACGGCTTACCATTTTT

La mezcla reaccionante se homogeneiza y coloca en un termociclador «*Master cycler personal Eppendorf*» y se somete al programa siguiente:

- 10
- 94°C 2 minutos
 - 94°C 1 minutos
 - 50°C 1 minutos
 - 70°C 30 segundos
 - 70°C 5 minutos
- } 35 ciclos

- 15 El DNA se conserva a continuación a 10°C. Se realiza igualmente el mismo trabajo reemplazando el triturado de ostras por 5, 10 y después 20 mL de agua de mar (procedente de un parque de ostras), siendo constante la cantidad de microbolas cargadas de β 2GPI e igual a 50 μ L.

Como comparación, se sometió el triturado de ostras a una extracción directa del DNA del virus por los dos productos de lisis antes definidos, sin adición previa de microbolas cargadas y se utilizaron las mismas condiciones de PCR.

- 20 En todos los casos, los DNA obtenidos por la PCR se utilizaron para hacer una transferencia Southern sobre gel de agarosa al 2 % en tampón PBE 0,5X que contenía bromuro de etidio. El gel se observó luego bajo luz UV. El conjunto de los resultados está presente en la figura 1 en la cual las pistas 1 a 13 representan los experimentos definidos por la tabla II:

Tabla II

Pista de	Experimento
1	Triturado + PBS + 10 µL de microbolas
2	Triturado + PBS + 20 µL de microbolas
3	Triturado + PBS + 50 µL de microbolas
4	Triturado + Acetato Na/Cu ²⁺ 10 µl de microbolas
5	Triturado + Acetato Na/Cu ²⁺ 20 µl de microbolas
6	Triturado + Acetato Na/Cu ²⁺ 50 µl de microbolas
7	Triturado + extracción directa con Chelex
8	Triturado + extracción directa con fenol /cloroformo

La figura 1 muestra una misma señal positiva sobre las pistas 1 a 8: el DNA del virus obtenido por extracción directa (pistas 7 y 8) es pues el obtenido gracias a las microbolas (pistas 1 a 6). Se han secuenciado todos estos DNA: el amplicón obtenido por las microbolas corresponde a una secuencia de 709 bases del gen de la glicoproteína 100S del virus OsHV-1. Cuando el triturado se diluye en PBS (pistas 1 a 3), la señal es la misma cualquiera que sea la cantidad de microbolas utilizada, mientras que en presencia de iones Cu²⁺ (pistas 4 a 6), la señal es tanto más fuerte cuanto mayor sea la cantidad de bolas; además, en presencia de Cu²⁺ (pistas 4 a 6), la señal es siempre más fuerte que en ausencia de Cu²⁺ (pistas 1 a 3). Esto demuestra el interés de la presencia de los iones Cu²⁺ que mejoran la sensibilidad de la detección.

En las pistas 9 a 11, se ve que aparecía débilmente una señal en la pista 11, mientras que una extracción directa sobre el agua de mar había dado un resultado negativo, lo que muestra igualmente que, sin los iones Cu²⁺, la detección por las microbolas es débil.

La pista T⁺ es un testigo positivo obtenido con la secuencia de DNA viral para establecer que la PCR ha funcionado bien; la pista Tmix es un testigo obtenido con todos los ingredientes empleados en la PCR, pero en ausencia de DNA viral.

EJEMPLO 3: Detección del virus de la hepatitis C (VHC).

50 µL de suero procedente de enfermos infectados por el virus de la hepatitis C se diluyen en 500 µL de tampón de acetato de sodio 50 mM (pH = 5,6 con HCl 10 mM). A este medio se añaden 10 µL de microbolas cargadas con β2GPI, idénticas a las que han sido preparadas en el ejemplo 1. Igualmente se añaden sales férricas, cúpricas, de zinc y de manganeso de modo que se obtenga un medio en el cual los iones metálicos están presentes a 2 mM. Este conjunto se deja incubar a 37°C durante 30 minutos, con agitación rotatoria. A continuación se lleva, a lo largo del tubo que contiene la muestra, un imán permanente, que permite separar las microbolas de su medio de suspensión, y se elimina el líquido sobrenadante. Las microbolas se someten a una lisis según el protocolo del kit «*QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen)*». Los ácidos nucleicos virales se someten a un protocolo de RT-PCR: El protocolo de RT-PCR ha sido descrito anteriormente por Young et al. (*J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31(4), pp. 882-6). A 4 µL de extractos de RNA, se añaden 21 µL de la solución de amplificación (kit *RT-PCR One step Qiagen*) a las concentraciones finales siguientes:

Tampón Qiagen	IX
dNTP	400 µM
Cebadores	0,6 µM cada uno
Taq Polimerasa	1,5 U
Inhibidor de RNasa	15 U

Los cebadores utilizados son los siguientes:

KY78 (sentido): CAAGCACCTATCAGGCAGT

KY80 (antisentido): AGCGTCTAGCCATGGCGT

Después de homogeneización las mezclas reaccionantes se colocan en un termociclador (*Master cycler personal*)

Eppendorf) y se someten al programa siguiente:

5	50°C: 3 minutos	}	35 ciclos
	95°C: 15 minutos		
	95°C 1 minuto		
	55°C: 1 minuto		
	70°C: 1 minuto		
	72°C: 1 minuto		

Los DNA se mantienen a continuación a 4°C y se efectúa una transferencia Southern correspondiente a la Figura 2.

10 La figura 2 muestra que en presencia de Cu^{2+} , la sensibilidad de detección del virus de la hepatitis C es netamente mejorada. Por el contrario, en presencia de Zn^{2+} , el virus no es detectable, y esto, cualquiera que sea el pH de la muestra.

15 La figura 3 muestra los resultados obtenidos para una muestra (suero o plasma) que contiene 130 copias del genoma viral por mL de muestra. La definición de las muestras correspondientes a las 16 pistas se da en la tabla III. En la figura 3 se constata que en ausencia de microbolas magnéticas cargadas de $\beta 2\text{GPI}$, no hay señales que muestren la presencia viral: se alcanza el límite de sensibilidad del método utilizado. Por el contrario, en presencia de Cu^{2+} , la señal del virus se hace visible.

Tabla III

Pista nº	Muestra ensayada	Pista nº	Muestra ensayada
1	suero pH 7,6 + 6 microbolas	10	plasma pH 5,6 + microbolas
2	suero pH 7,6 + Cu^{++} + microbolas	11	plasma pH 5,6 + Cu^{++} + microbolas
3	suero pH 7,6 + Fe^{++} + microbolas	12	plasma pH 5,6 + Fe^{++} + microbolas
4	suero pH 5,6 + microbolas	13	suero detección en ausencia de microbolas
5	suero pH 5,6 + Cu^{++} + microbolas	14	plasma detección en ausencia de microbolas
6	suero pH 5,6 + Fe^{++} + microbolas	15	control positivo

20 Por otro lado se ha establecido que los iones Cu^{2+} actúan sobre la muestra y no sobre las microbolas. Para hacer esto, se añade acetato cúprico 2 mM sobre microbolas cargadas con $\beta 2\text{GPI}$. Se deja incubar a 37°C durante 30 minutos con agitación. Las microbolas se lavan a continuación y se ponen en contacto con la muestra de suero que no contiene Cu^{2+} . La tabla IV identifica la naturaleza del ensayo correspondiente a cada una de las pistas 1 a 6 de la figura 4.

Tabla IV

Pista nº	Naturaleza del ensayo
1	$\beta 2\text{GPI}$ + Cu^{++} + lavado + VHC
2	$\beta 2\text{GPI}$ + Cu^{++} + VHC
3	VHC en ausencia de $\beta 2\text{GPI}$
4, 5	Control positivo

25

EJEMPLOS 4 a 8: Detección de otros virus

Se utilizaron protocolos de ensayo idénticos a los que se han descrito antes en los ejemplos 2 o 3 según se trate respectivamente de virus de DNA o de RNA.

30 Se constató que para todos estos virus, los resultados eran los mismos que los descritos en los ejemplos 2 o 3. Los virus que son el objeto de estos ensayos son: los virus del Nilo occidental, el Hantavirus tipo Andes, el virus del dengue sub-tipo 1, 2, 3 y 4, el virus VIH 1 y 2 y el virus de la gripe H1N1 y H1N2.

EJEMPLO 9 Captura de virus de la gripe H3N2 por microbolas en medio cúprico y utilización de microbolas cargadas de virus para la detección visual de dichos virus.

Una muestra tomada de la faringe de un paciente afectado por un estado gripal, se diluye en medio de cultivo MEM (medio esencial mínimo de «Eagle») que contiene sulfato cúprico 2 mM. Se le añaden 10 µL de microbolas, tales como las preparadas en el ejemplo 1: estas microbolas están pues cargadas con β2GPI. Las microbolas se ponen en contacto con 500 µL del medio donde se encuentra la muestra tomada, colocándose todo en un tubo Eppendorf de 2 mL. La mezcla se incuba a 37°C bajo agitación rotatoria durante 30 minutos. El tubo se pone a continuación en contacto con un imán permanente; las microbolas son atraídas por el campo magnético contra la pared; se aspira y elimina el líquido sobrenadante. Se añade al tubo 1,5 mL de tampón PBS (composición dada en el ejemplo 1) para obtener una suspensión de microbolas; el tubo se vuelve a poner en contacto con el imán permanente y se aspira y elimina el líquido sobrenadante. Esta operación de lavado de las microbolas se repite tres veces en total, después las microbolas se vuelven a poner en suspensión en 1 mL de tampón de cultivo MEM.

La suspensión así obtenida se pone en contacto con células MDCK a 37°C durante 24 horas. Las células se lavan a continuación dos veces en suero fisiológico y se añade medio de cultivo MEM recientemente preparado y las células se cultivan durante 4 días a 37°C. Se comprueba si hay infección bien sea por efecto citopatógeno del virus después de la coloración de las células por el colorante violeta cristal (véase la figura 5), bien sea por inmunofluorescencia, después de fijación de las células por acetona y reacción con anticuerpos monoclonales fluorescentes, que reconocen las proteínas virales (figuras 6A y 6B).

En la figura 5, la cápsula de Petri de la parte izquierda, corresponde a 6000 ufp (unidades formadoras de placas) de virus (1 ufp permite formar un foco de lisis), la vista de la parte central corresponde a 2000 ufp de virus y la vista de la parte derecha corresponde a 200 ufp de virus. La desaparición progresiva de células muestra que las microbolas llevaban virus con efecto citopatógeno.

En la figura 6A, se ve que las células que llevan proteínas virales son localizadas por fluorescencia: se ha puesto el medio de cultivo que contiene la muestra viral directamente en contacto con las células MDCK y se constata que pocas células son fluorescentes lo que muestra que la captura del virus ha sido de escasa importancia en ausencia de utilización de microbolas. La figura 6B muestra el resultado obtenido con la utilización de microbolas: se establece por tanto que las microbolas han concentrado el virus de la muestra, lo que permite por consiguiente una detección con una carga viral mucho más pequeña.

EJEMPLO 10: Captura del virus de la viruela vacuna por las microbolas cargadas con β2GPI y utilización de estas últimas para infectar células.

Se aplica el mismo protocolo que el detallado en el ejemplo 9 para la infección de células Hep 2, por el virus de la viruela vacuna capturado por microbolas cargadas con β2GPI. Para este ejemplo, se utilizó una suspensión de virus que permite formar 1000 focos de lisis (1000 ufp).

La figura 7A muestra la situación cuando el virus de la viruela vacuna fue capturado por microbolas cargadas con β2GPI: se observa que han sido infectadas numerosas células. Por el contrario, la figura 7B muestra el caso en el que las células Hep 2 fueron infectadas por el virus de la viruela vacuna en ausencia de microbolas cargadas con β2GPI: se ve que el número de células fluorescentes está mucho más restringido, lo que permite llegar a la conclusión de que las microbolas cargadas con β2GPI han permitido concentrar los virus utilizados, puesto que la cantidad de virus era la misma para los ensayos de las figuras 7A y 7B.

La figura 7C muestra células Hep 2 puestas en contacto con el tampón de lavado de las microbolas después de que estas hayan sido cargadas con β2GPI y el virus de la viruela vacuna: se constata que hay ausencia de fluorescencia, lo que quiere decir que el tampón de lavado no arrastra ninguno de los virus fijados sobre las microbolas.

Se constata pues que las microbolas cargadas con β2GPI permiten mejorar la sensibilidad de la detección de los virus.

45

REIVINDICACIONES

- 5 Procedimiento de detección y/o cuantificación y/o identificación *in vitro* de compuestos infecciosos (CI) presentes en un medio fluido M que constituye una material biológico, procedimiento en el cual, de modo conocido, se prepara una suspensión, en un medio líquido de suspensión, de microbolas delimitadas por un superficie externa constituida por un material polímero sólido susceptible de fijar proteínas, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- a) se asegura una carga de las microbolas de la suspensión con proteínas β 2GPI por acoplamiento con una cantidad suficiente de proteínas β 2GPI, bien sea de forma pasiva en un medio de suspensión o bien sea utilizando un protocolo de unión química conocido;
 - 10 b) se ponen en contacto, en un recipiente, dichas microbolas cargadas con proteínas β 2GPI con el medio fluido M añadiendo iones de al menos un metal oxidante, en condiciones apropiadas para asegurar una fijación suficiente de los compuestos infecciosos sobre las proteínas β 2GPI llevadas por las microbolas;
 - c) se separan las microbolas así preparadas de su medio de suspensión, se evacua dicho medio de suspensión del contenedor para obtener, eventualmente después de un lavado con un tampón, un residuo con una fuerte concentración de compuestos infecciosos;
 - 15 d) y se detectan y/o cuantifican y/o identifican los compuestos infecciosos a partir del residuo concentrado así obtenido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se efectúa la carga de las microbolas, en la etapa a) de la reivindicación 1, de modo pasivo en un tampón que tiene un pH comprendido entre 3,5 y 10,5, dejando en incubación, durante un tiempo comprendido entre 10 minutos y 24 horas, a una temperatura comprendida entre 4 y 40°C.
- 20 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque se efectúa la carga de las microbolas con proteínas β 2GPI poniéndolas en un medio líquido de suspensión que contiene, en solución acuosa, de 10^{-6} a 100 mg de β 2GPI por gramo de peso seco de microbolas, estando comprendida la concentración del medio en β 2GPI entre 10^{-5} y 10 μ g/ μ l.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la carga de las microbolas con proteínas β 2GPI se efectúa en un tampón que tiene un pH comprendido entre 5 y 9 con una incubación durante un tiempo comprendido entre 10 minutos y 24 horas a una temperatura comprendida entre 4 y 40°C.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque en la etapa b), los iones de metal oxidante añadidos al medio M son iones cúpricos, estando comprendida la concentración de iones cúpricos en el medio M, después de dicha adición, entre 1 mM y 100 mM.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el material sólido constitutivo de la superficie externa de las microbolas se elige del grupo formado por materias plásticas y elastómeros, llevando o no dicho material grupos reactivos injertados en la superficie externa de las microbolas para asegurar un enlace químico con las proteínas β 2GPI.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se eligen las microbolas que tienen una forma sensiblemente esférica y un diámetro medio comprendido entre 1 y 100.000 nm.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque se eligen las microbolas que tienen un núcleo formado de una o varias partículas de material magnético para permitir su separación con respecto al medio de suspensión gracias a un campo magnético.
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque las microbolas se separan por centrifugación de su medio de suspensión.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se realiza la etapa d) de la reivindicación 1 por un medio elegido del grupo formado por infecciosidad, una reacción enzimática específica, un trazador fluorescente o radiomarcado, una detección de ácidos nucleicos específicos por hibridación con una sonda marcada, una reacción PCR o RT-PCR, una valoración, un recuento, una visualización, un procedimiento óptico, una microscopía electrónica o no.
- 45 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque los compuestos infecciosos son bacterias.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque los compuestos infecciosos son virus.
- 50 13. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque se detectan y/o cuantifican y/o identifican las

bacterias del medio fluido M a partir del residuo por lectura de la densidad óptica, por ATP-metría o por PCR.

5 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado porque los ácidos nucleicos de los CI de interés se extraen por lisis, a partir del residuo concentrado, porque dichos ácidos nucleicos se amplifican por PCR o RT-PCR, utilizando los cebadores apropiados para dichos CI de interés y porque se practica una visualización sobre gel de los ácidos nucleicos eventualmente obtenidos para definir la presencia o ausencia de dichos CI de interés y/o para cuantificar la carga viral de dichos CI de interés en el medio M.

10 15. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque para detectar y/o identificar los virus de interés fijados sobre las microbolas obtenidas según la etapa c) de la reivindicación 1, se vuelve a poner en suspensión el residuo, se ponen en contacto dichas microbolas con células sensibles a los virus de interés, se cultivan dichas células y se observa la eventual infección de las células por los virus de interés.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque, para detectar una infección de células, se observa el efecto citopatológico de los virus después de una coloración apropiada de las células, o inmunofluorescencia después de fijación de las células y reacción con anticuerpos fluorescentes que reconocen proteínas correspondientes a la presencia de virus.

15



FIGURA 1

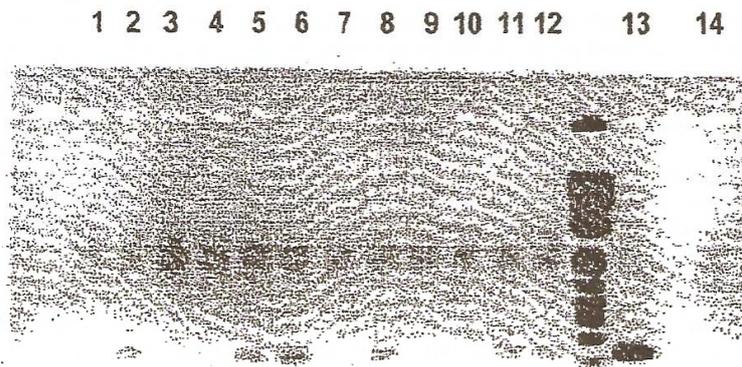


FIGURA 2

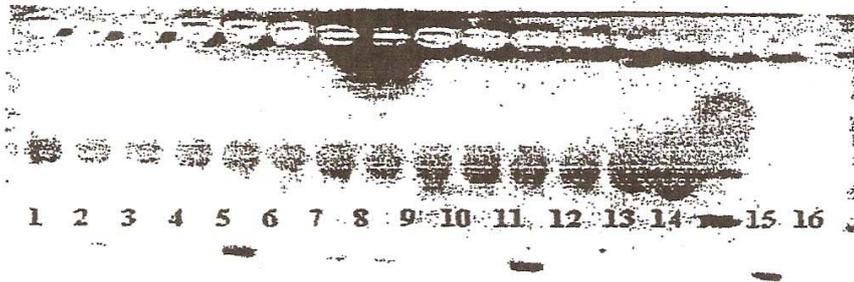


FIGURA 3

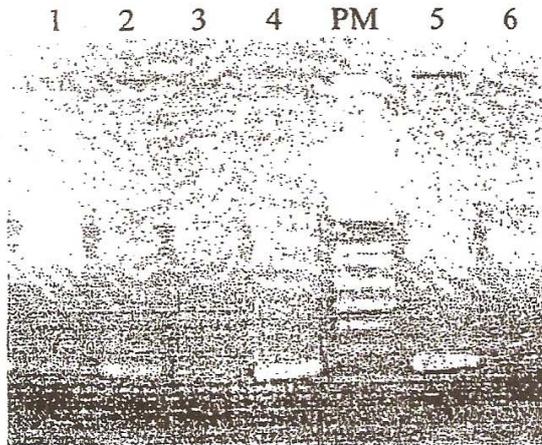


FIGURA 4

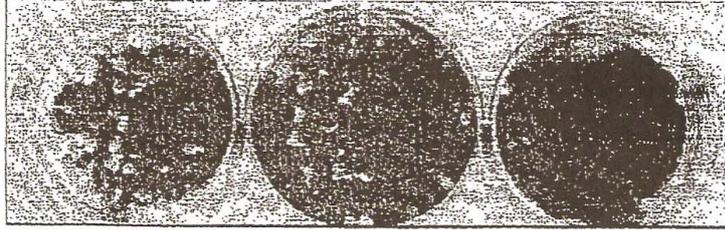


FIGURA 5

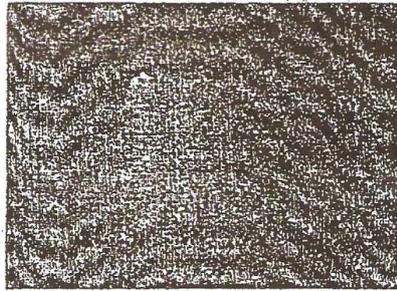


FIGURA 6A

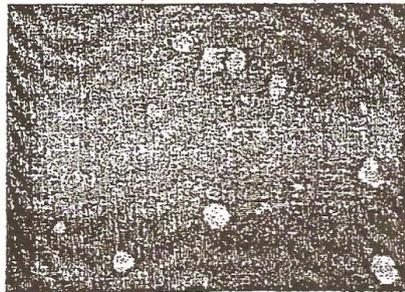


FIGURA 6B

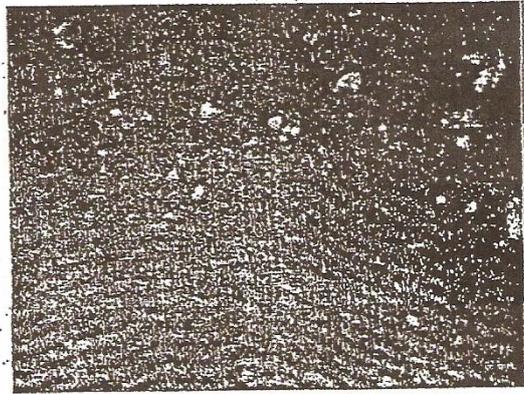


FIGURA 7A

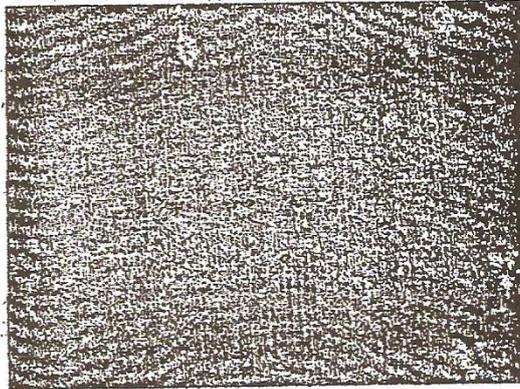


FIGURA 7B

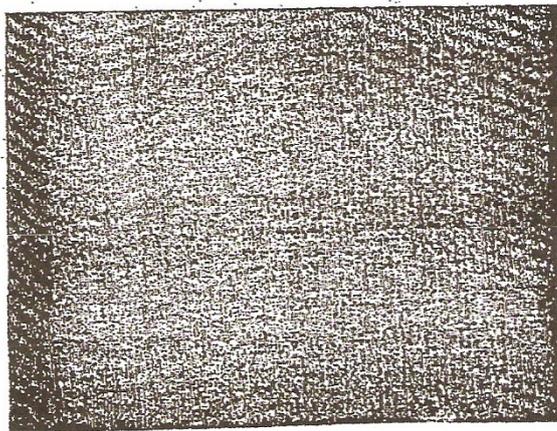


FIGURA 7C