

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 412**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2007 E 07858591 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2082233**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico in vitro de cepas de Staphylococcus aureus productoras de PVL**

30 Prioridad:

18.10.2006 FR 0654336

06.02.2007 FR 0753081

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

19.03.2013

73 Titular/es:

BIOMERIEUX (33.3%)

CHEMIN DE L'ORME

69280 MARCY-L'ETOILE, FR;

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA

RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%) y

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 (UCBL)

(33.3%)

72 Inventor/es:

BADIOU, CÉDRIC;

ETIENNE, JÉRÔME;

LINA, GÉRARD y

RATAT, CATHERINE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 412 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 diagnóstico *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL.

5 La presente invención se refiere a las infecciones asociadas con la presencia de bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus* y a la especie *Staphylococcus aureus* productora de leucocidina de Pantón-Valentine (conocida por su abreviatura en inglés PVL, por la expresión *Panton Valentine Leukocidin*). Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL por un inmunoensayo de rutina en una muestra biológica que pueda contener cepas de *Staphylococcus aureus*.

10 Las infecciones por cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL son las principales responsables de infecciones extrahospitalarias. La bacteria *Staphylococcus aureus* expresa una gran variedad de factores de virulencia, entre los cuales se encuentra la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), que es una citotoxina que favorece las lesiones tisulares¹. La PVL es una toxina presente frecuentemente en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina y transmisibles extrahospitalariamente (abreviadamente CA-MRSA por la expresión inglesa «*Community acquired methicillin-resistant S. aureus*») propagándose en el mundo entero².

15 La PVL, así como otras leucocidinas es una proteína perteneciente a la familia de las toxinas sinergo-himenotrópicas. Todas las toxinas de esta familia están constituidas por dos componentes polipeptídicos, de acción sinérgica, denominados S y F. La PVL es codificada por dos genes contiguos cotranscritos, *lukF-PV* y *lukS-PV*. La PVL es una exotoxina porque es excretada en el medio extracelular después de la lisis o no de la bacteria, a diferencia de las endotoxinas o lipopolisacáridos, que no son liberadas más durante la destrucción de la bacteria Gram-negativa que las secreta.

20 Las cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL, son bacterias Gram-positivas, asociadas a determinadas infecciones humanas, tales como infecciones cutáneas, subcutáneas de tipo forúnculos, abscesos, celulitis y miositis, infecciones osteoarticulares, así como neumonías necrosantes graves que afectan principalmente a niños y adultos jóvenes con una tasa de mortalidad de aproximadamente el 70%.

25 La patogénesis no se conoce completamente, pero varias líneas de evidencia sugieren que la PVL desempeña una función importante en la fisiopatología de las infecciones por cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL:

- i) la fuerte relación epidemiológica con los aislados de *S. aureus* que sintetizan la PVL y la presentación clínica de la infección,
- ii) la elevada frecuencia de leucopenia, un efecto conocido de la PVL,
- 30 iii) las lesiones necróticas del tracto respiratorio, que se asemejan a la necrosis inducida por inyección intradérmica de la PVL en conejos,
- iv) la presencia de PVL en el pulmón al que se dirigen las células polimorfonucleares,
- v) solo las cepas productoras de PVL o la PVL purificadas inducen una neumonía necrosante en los modelos experimentales³.

35 La detección de cepas de *S. aureus* productoras de PVL se realiza actualmente por ensayos de detección de ácidos nucleicos, y principalmente por detección de los genes *lukF-PV* y *lukS-PV*, por PCR³.

Dichos ensayos tienen como inconvenientes ser indirectos porque no permiten afirmar que el gen sea funcional y/o expresado, son caros debido a la necesidad de equipo específico, poco rápidos y difíciles de realizar. Además, en el contexto de la utilización de una PCR, pueden ocurrir problemas de contaminación.

40 La detección de la PVL ha sido igualmente realizada siempre por inmunodifusión con ayuda de anticuerpos policlonales⁴, pero esta técnica se abandonó rápidamente en favor de la detección de genes, porque no es fácil y difícilmente estandarizable, de modo que no es una buena herramienta para ser utilizada rutinariamente.

45 Debido a la gravedad de ciertas infecciones por cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL, es urgente disponer de un ensayo rápido y sencillo de realizar, que supere las desventajas de los ensayos actualmente utilizados para la detección de cepas de *S. aureus* productoras de PVL.

La solicitud de patente europea EP 597110 A describe que la detección de MRSA puede ser realizada por inmunoensayos de rutina usando anticuerpos monoclonales anti-PVL. Sin embargo, aunque estos ensayos permiten superar los inconvenientes anteriores, la especificidad de la detección no es suficiente.

50 La publicación científica de Kasai et al., (Kasai S. et al., 2000, *Analytical Chemistry*, 72 (23):5761-5765) se refiere al diagnóstico *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) y

describe un procedimiento para detectar la PVL por un inmunoensayo de rutina sin la etapa preliminar de desnaturalización de la muestra.

5 Contra toda expectativa, los inventores han demostrado ahora que la especificidad de la detección de las cepas de *S. aureus* productoras de PVL por un inmunoensayo de rutina podría mejorarse mediante un tratamiento previo de la muestra biológica para desnaturalizar la PVL, puesto que los expertos en la técnica saben que, como cualquier exotoxina, la PVL es sensible a los agentes físico-químicos, como la temperatura⁵.

10 Por lo tanto, la presente invención tiene por objeto un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de leucocidina de Panton-Valentine (PVL) a partir de una muestra biológica obtenida de un individuo propenso a ser colonizado o infectado por *Staphylococcus aureus*, realizándose el diagnóstico mediante la detección de la PVL por un inmunoensayo de rutina, caracterizado porque dicha muestra biológica se trata previamente con el fin de desnaturalizar la PVL.

15 Por la expresión cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL, se entiende todas las cepas de *Staphylococcus aureus* capaces de producir la PVL, a saber, tanto las cepas sensibles a la metilicina (abreviadamente MSSA por la expresión inglesa *methicillin sensible-Staphylococcus aureus*) como las resistentes a la metilicina (MRSA por la expresión inglesa *methicillin resistant-Staphylococcus aureus*).

Por individuos propensos a ser colonizados por *Staphylococcus aureus*, se entiende los individuos con riesgo de poder ser portadores sanos de esta bacteria, tales como el personal de hospitales. Por individuo propenso a ser infectado por *Staphylococcus aureus*, se entiende los pacientes que muestran síntomas de infección por *Staphylococcus aureus*.

20 Por infección por *Staphylococcus aureus*, se entiende cualquier infección provocada por la presencia de esta bacteria en un organismo, aunque estas infecciones sean por las cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL o por cepas de *Staphylococcus aureus* que no tengan dicha capacidad. Como ejemplo de tales infecciones, se pueden citar infecciones supurativas de la piel y de los tejidos blandos, infecciones de las vías respiratorias, infecciones del sistema nervioso central, infecciones de las vías urinarias, infecciones endovasculares y de las válvulas del corazón e infecciones musculares y óseas. Tales infecciones y sus síntomas asociados son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica y se describen por ejemplo en el texto *Précis de Bacteriologie Clinique*⁵.

30 Por muestra biológica obtenida de un individuo propenso a ser colonizado o infectado por *Staphylococcus aureus*, se entiende cualquier muestra susceptible de contener estas bacterias o bien la PVL excretada, tal como pus, exudado respiratorio, exudado nasal, orina o hemocultivo.

35 La muestra biológica utilizada en el procedimiento de la invención puede ser la muestra sin modificar o puede ser un cultivo bacteriano procedente de esta muestra. El cultivo puede ser realizado en un medio sólido, tal como una placa de Petri o en un caldo, entendiéndose que el caldo de cultivo puede ser inoculado por dicha muestra o por colonias de *Staphylococcus aureus* aisladas previamente de dicha muestra biológica mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como por siembra en placas de Petri. El inmunoensayo se utilizará entonces o bien directamente sobre el medio sólido o bien en el caldo de cultivo. En general, el cultivo de las bacterias de interés o de dicha muestra dura alrededor de 24 horas. Cabe señalar que, cualquiera que sea el cultivo, el medio de cultivo comprende un agente que favorezca la producción de PVL, como el medio CCY (medio de hidrolizado de caseína y extracto de levadura), con o sin el uso de moléculas que permitan una mayor producción de PVL, tales como oxacilina y bacitracina en dosis sub-inhedoras.

Por inmunoensayo, se entiende cualquier inmunoensayo que utilice una pareja de unión capaz de unirse específicamente a la PVL, ya sea la fracción LukF de la PVL, la fracción LukS de la PVL, o bien ambas fracciones simultáneamente.

45 Por inmunoensayo de rutina se entiende cualquier inmunoensayo ampliamente utilizado en el laboratorio rutinariamente. Como ejemplo de los inmunoensayos de rutina se pueden citar ensayos sándwich de tipo ELISA o inmunocromatográficos (también llamados de flujo lateral) y los ensayos de aglutinación de partículas, por ejemplo, partículas de poliestireno. Todos estos ensayos son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica. El ensayo de tipo sándwich se puede realizar en una o varias etapas, es decir, sin una etapa de lavado, o con una o varias etapas de lavado.

50 Como ejemplos de parejas de unión específica de PVL se pueden citar anticuerpos, fracciones de anticuerpos, receptores, mimótopos y cualquier otra molécula capaz de unirse a la PVL.

Los anticuerpos parejas de unión, son por ejemplo, anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

55 Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse mediante inmunización de un animal con la PVL, una fracción de la PVL o un péptido de la PVL, seguido por la recuperación del suero de dicho animal. Los anticuerpos pueden utilizarse purificados o no en el procedimiento de la invención. La purificación de los anticuerpos policlonales se

puede realizar, por ejemplo, por recogida del suero de dicho animal y separación de los anticuerpos de los otros constituyentes del suero, principalmente por cromatografía de afinidad en una columna a la que se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, principalmente la PVL.

5 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por la técnica de hibridomas, cuyo principio general se describe a continuación.

10 En una primera etapa se inmuniza un animal, generalmente un ratón (o células cultivadas en el marco de inmunizaciones *in vitro*) con la PVL, una fracción de la PVL o un péptido de la PVL, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir anticuerpos contra dicho antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos se fusionan a continuación con células mielomatosas "inmortales" (de muridos en el ejemplo) para dar lugar a hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenidas, se efectúa entonces una selección de células capaces de producir un anticuerpo específico y de multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de un clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la PVL. Los anticuerpos pueden purificarse o no en el procedimiento de la invención. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar principalmente por la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.

15 Los anticuerpos monoclonales también pueden ser anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Por fragmentos de anticuerpo útiles para los fines de la invención, se entienden fragmentos de tipo F(ab')₂, Fab, Fab', scFv de un anticuerpo natural, que han conservado la capacidad de unirse específicamente a la PVL.

20 El procedimiento de la invención se realiza preferentemente con las siguientes características, tomadas por separado o en combinación:

- el inmunoensayo de rutina es un método de tipo sándwich,
- emplea parejas(s) de unión específica(s) de LukS-PV o LukF-PV,
- emplea fragmentos de anticuerpos y, principalmente, el fragmento F(ab')₂.

25 En el marco de un ensayo de tipo sándwich que utiliza dos parejas de unión específica a la PVL se pueden usar, por ejemplo, dos anticuerpos monoclonales, dos anticuerpos policlonales o sus fragmentos, o un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal o sus fragmentos. En el marco de un ensayo de aglutinación de partículas, se utiliza sólo una pareja de unión específica a la PVL, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, en forma de fragmento o no.

Según un modo de realización particular, el inmunoensayo utiliza al menos un anticuerpo monoclonal anti-PVL.

30 En el marco de un ensayo de aglutinación de partículas, la pareja de unión específica a la PVL se utiliza para la captura. En el marco de un ensayo de tipo sándwich, se utiliza para la captura y para la detección.

Cuando la pareja de unión se utiliza como reactivo de detección, está marcada para poner de manifiesto la unión PVL/pareja de unión.

35 Por marcaje de las parejas de unión, se entiende la fijación de un marcador capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no exhaustiva de estos marcadores consiste en:

- enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo, por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como peroxidasa de rábano silvestre, fosfatasa alcalina, α-galactosidasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa,
- cromóforos, tales como compuestos fluorescentes, luminiscentes y colorantes
- moléculas radiactivas como ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I, y
- 40 • moléculas fluorescentes, tales como alexa o ficocianinas.

También se pueden usar sistemas de detección indirectos, como por ejemplo, ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Las parejas ligando/anti-ligando son bien conocidas por los expertos en la técnica, que es el caso por ejemplo, de las siguientes parejas: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/polinucleótido complementario. En este caso, es el ligando el que lleva la pareja de unión. El anti-ligando puede ser detectado directamente por los marcadores descritos en el párrafo anterior o ser detectado el mismo por un ligando/anti-ligando.

45 Estos sistemas de detección indirectos pueden conducir, bajo ciertas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por los expertos en la técnica, y se puede hacer referencia al artículo de *J. Histochem. Cytochem*⁶. 45:481-491, 1997.

Dependiendo del tipo de marcaje utilizado, el experto en la técnica añadirá los reactivos que permitan la visualización del marcaje.

En el caso de los métodos denominados de competición, la PVL se marca como se ha descrito anteriormente para la pareja de unión.

- 5 La pareja de unión específica de la PVL, si se utiliza para la captura, es entonces inmovilizada directa o indirectamente en una fase sólida mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

El tratamiento previo de la muestra utilizada en el procedimiento de la invención puede ser cualquier tratamiento de desnaturalización de proteínas ampliamente conocido por los expertos en la técnica. Este tratamiento se puede realizar por ejemplo, por modificación del pH, por utilización de agentes desnaturalizantes químicos, tales como urea, dodecilsulfato de sodio (SDS), iones de guanidinio o por calentamiento de la muestra en la que se encuentra la proteína que se ha de desnaturalizar.

Según un modo de realización, el tratamiento previo de dicha muestra consiste en calentar a una temperatura comprendida entre 60 y 100°C, durante un período de al menos 10 minutos. Preferiblemente, el calentamiento se realiza a una temperatura comprendida entre 80 y 100°C, incluso preferiblemente entre 90 y 100°C.

- 15 Por supuesto el tratamiento previo de la muestra se aplicará a la muestra propiamente dicha cuando el inmunoensayo de rutina se lleve a cabo en dicha muestra, o se aplicará al cultivo cuando el inmunoensayo se realice en dicho cultivo.

El procedimiento de la invención también puede comprender una etapa suplementaria de verificación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en dicha muestra biológica, pudiendo realizarse esta etapa de forma previa o simultánea. Los procedimientos de detección de estas bacterias son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el uso de medios que contienen una agente cromógeno específico de esta bacteria, tal como se describe por ejemplo en la solicitud de patente WO 02079486 presentada por una de las firmas solicitante.

De manera similar, el procedimiento de la invención puede comprender una etapa suplementaria que consiste en determinar si las cepas de *Staphylococcus aureus* presentes en dicha muestra biológica son bacterias resistentes a la meticilina (MRSA) o sensibles a la meticilina (MSSA), lo que constituye un modo de realización particular de la invención.

Esta etapa de determinación de la sensibilidad a la meticilina (MRSA o MSSA) puede ser realizada por procedimientos ampliamente conocidos por los expertos en la técnica, tales como inmunoensayos que utilizan, por ejemplo, una pareja de unión específica para la proteína PBP2', que es una proteína expresada solamente por las MRSA, ensayos de detección del ácido nucleico o ensayos microbiológicos, por ejemplo, que utilizan un medio que contiene un antibiótico, tal como oxacilina o una cefalosporina, por ejemplo cefoxitina .

La invención se comprenderá mejor con ayuda de los siguientes ejemplos que se dan a modo de ilustración y no de limitación, así como con ayuda de las Figuras 1 a 3 adjuntas, en las que:

- 35 - La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo ELISA (Densidad óptica (DO) de cada cepa) para la detección de la PVL en muestras biológicas que contienen cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL (PVL+) o no productoras de PVL (PVL-),
- 40 - La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo ELISA (Densidad óptica (DO) de cada cepa) para la detección de la PVL en muestras biológicas que contienen cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL (PVL+) o no productoras de PVL (PVL-), habiendo sido tratada previamente dicha muestra por calentamiento para desnaturalizar la PVL, y
- 45 - La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo ELISA (Densidad óptica (DO) de cada cepa) para la detección de PVL en muestras biológicas que contienen cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL (LY990084, A92007, LUG855) o no productoras de PVL (LY990333, LY991321, RN6911), habiendo sido tratada previamente dicha muestra por calentamiento (tratamiento 1), por un agente químico desnaturalizante (tratamiento 2), por un agente desnaturalizante y por calentamiento (tratamiento 3), correspondiendo el estado 0 a ningún tratamiento previo de la muestra.

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos anti-PVL

1. Producción de PVL recombinante

50 Se produjeron las proteínas LukS His-Tag y LukF His-Tag de secuencias respectivas SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 usando el vector pIVEX de 2,4d (Roche) transformado en una cepa de *Escherichia coli* BL21 *star*(DE3) pLys (Invitrogen) durante un cultivo de 2 litros a 37°C con agitación, inducción durante 3 horas a 37°C por IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido, Eurobio) 1 mM y después un cultivo durante 5 horas más. El cultivo se repartió en 6 tubos diferentes.

Cada sedimento celular se recuperó por centrifugación a 4000 g durante 20 minutos y eliminación del líquido sobrenadante. La purificación de las proteínas recombinantes se realizó usando el kit "The QIAexpressionist" según las recomendaciones del proveedor (Qiagen). El sedimento se lisó con 20 ml de una solución de lisis no desnaturalizante (Qiagen) a 4°C, y después se conservó durante una noche a -80°C. Después de descongelación, la lisis fue seguida por tratamiento con 1 mg/ml de lisozima (Eurobio) durante 1 hora a 4°C antes de un tratamiento con ultrasonidos en un aparato Vibracell (Bioblock) a 100 vatios, 2 minutos en ciclos de 6 segundos.

La solución se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C. El líquido sobrenadante se puso en contacto con 5 ml de agarosa-NiNTA (Qiagen) durante 3 horas a 4°C con agitación circular suave. La agarosa se introdujo luego en una columna de 20 ml (Biorad). La columna se lavó con 200 ml de tampón de lavado "Wash buffer" (Qiagen) y después se eluyó con imidazol 250 mM como tampón de elución. Esta purificación se completó con una purificación en columna de intercambio iónico monoSP (Amersham).

Las proteínas recombinantes se concentraron en un aparato Centricon (Vivaspin), se dializaron contra un tampón MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) 50 mM y se eluyó con un gradiente de NaCl (0 a 1 M). Las proteínas se dializaron luego contra agua estéril libre de pirógenos.

15 2. Producción de anticuerpos monoclonales

Se obtuvieron los anticuerpos monoclonales siguientes:

- anti-LukF: 10D1A10, 16A10A3, 6H10E5 y
- anti-LukS: 2H2H12, 3D9D12, 7C1F9, 7F8D7, 18A4E10

como sigue:

20 *Anticuerpos monoclonales anti-LucF: 10D1A10, 16A10A3, 6H10E5.*

Se inmunizaron ratones según el protocolo siguiente: en el día 0 inyección intraperitoneal de 10 µg de proteína recombinante LukF en presencia de adyuvante completo de Freund. Los días 14 y 28, nueva inyección intraperitoneal de la misma cantidad de proteína recombinante LukF en presencia de adyuvante incompleto de Freund. Cuatro días antes de la fusión se les puso una inyección intravenosa de 50 µg de antígeno LukF diluido en solución salina fisiológica.

Se cribaron 1600 líquidos sobrenadantes por la técnica ELISA indirecto. Las placas fueron "revestidas" con 100 µl de antígeno (proteína recombinante LukF) a 1 µg/ml en tampón PBS, pH 7,2. Las placas "revestidas" se incubaron durante una noche a la temperatura de 18-22°C. Las placas se saturaron con 200 µl de PBS-1% de leche y se incubaron durante 1 hora a 37°±2°C. Se añadieron 100 µl de líquidos sobrenadantes o líquido ascítico diluidos en tampón PBS-Tween 20 al 0,05% y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°±2°C. Se añadieron 100 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-Ig (H+L) de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch ref.: 115-055-062), diluido 1/2000 en tampón PBS-BSA al 1% y las placas se incubaron a continuación durante 1 hora a 37°±2°C. 100 µl de PNPP (Biomérieux, ref.: 60002990) con una concentración de 2 mg/ml en DEA-HCl (Biomérieux ref.: 60002989), pH = 9,8. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°±2°C. La reacción se bloqueó mediante la adición de 100 µl de NaOH 1N. Se realizaron tres lavados entre cada etapa con 300 µl de tampón PBS-Tween 20 al 0,05%. Se realizó un lavado adicional en agua destilada antes de añadir el PNPP.

72 líquidos sobrenadantes dieron positivos en ELISA indirecto con una DO > 0,6. Después de los ensayos de especificidad se produjeron los tres anticuerpos antes citados.

Anticuerpos monoclonales anti-LucS: 2H2H12, 3D9D12, 7C1F9, 7F8D7, 18A4E10.

40 Se inmunizaron ratones según el protocolo siguiente: en el día 0 inyección intraperitoneal de 10 µg de proteína recombinante LukS en presencia de adyuvante completo de Freund. Los días 14 y 28 nueva inyección intraperitoneal la misma cantidad de proteína recombinante LukS en presencia de adyuvante incompleto de Freund. Cuatro días antes de la fusión, se les puso una inyección intravenosa de 50 µg de proteína recombinante LukS diluida en solución salina fisiológica.

45 Se cribaron 1800 líquidos sobrenadantes por la técnica ELISA indirecto. Las placas fueron "revestidas" con 100 µl de proteína recombinante LukS a 1 µg/ml en tampón PBS, pH 7,2. Las placas "revestidas" se incubaron durante una noche a la temperatura de 18-22°C. Las placas se saturaron con 200 µl de PBS-1% de leche y se incubaron durante 1 hora a 37°±2°C. Se añadieron 100 µl de líquidos sobrenadantes o líquido ascítico diluidos en tampón PBS-Tween 20 al 0,05% y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°±2°C. Se añadieron 100 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-Ig (H+L) de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch ref.: 115-055-062), diluido 1/2000 en tampón PBS-BSA al 1% y las placas se incubaron a continuación durante 1 hora a 37°±2°C. Se añadieron 100 µl de PNPP (Biomérieux, ref.: 60002990) a la concentración de 2 mg/ml en DEA-HCl (Biomérieux, ref.: 60002989), pH = 9,8. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°±2°C. La reacción se bloqueó

mediante la adición de 100 µl de NaOH 1N. Se realizaron tres lavados entre cada etapa con 300 µl de tampón PBS-Tween 20 al 0,05%. Se realizó un lavado adicional con agua destilada antes de añadir el PNPP.

51 líquidos sobrenadantes dieron positivos en ELISA indirecto con una DO > 0,6. Después de los ensayos de especificidad se produjeron los cinco anticuerpos antes citados.

5 3. Producción de anticuerpos policlonales

3.1. Producción de anticuerpos policlonales anti-LukS

Se obtuvieron los anticuerpos policlonales anti-LukS nº 173/89 y 176/89 del modo siguiente:

10 En el día 0, conejos (New Zealand White) recibieron una inyección intradérmica de 200 µg de péptido sintético de LukS-PV de la secuencia CSGHDPNLFVGYKPYSQL (SEQ ID NO: 3) acoplado por su N terminal con KLH (hemocianina de lapa bocallave) (Agro-Bio). Los días 14, 28, 42 y 81, los conejos recibieron una nueva inyección subcutánea de la misma cantidad de péptido sintético acoplado a KLH. Se tomó suero de los animales los días 0, 49 y 89. Los sueros de los conejos tomados en el día 89 se purificaron por cromatografía de afinidad respecto a dicho péptido sintético. Para esto, dicho péptido se introdujo en una columna de 1 ml de Hi-Trap-Sepharose según las recomendaciones del fabricante (Amersham-Pharmacia). El suero se diluyó a la mitad en tampón PBS, pH 7,4, y luego se inyectó a razón de 1 ml/minuto en la columna. Después de lavado con PBS, pH 7,4, seguido por elución con mezcla de glicina 50 mM/HCl, pH 3, las fracciones eluidas se neutralizaron inmediatamente y se dializaron contra PBS 0,15 M, pH 7,4.

3.2. Producción de anticuerpos policlonales anti-LukF.

Se obtuvieron los anticuerpos policlonales anti-LukF como sigue:

20 En el día 0, conejos (New Zealand White) recibieron una inyección intradérmica de 200 µg de péptido sintético de LukF-PV de la secuencia CNFNWIGNNYKDENRATHTS (SEQ ID NO: 4) acoplado por su N-terminal con KLH (hemocianina de lapa bocallave) (Agro-Bio). Los días 14, 28, 42 y 81, los conejos recibieron una nueva inyección subcutánea de la misma cantidad del péptido sintético acoplado a KLH. Se tomó suero de los animales los días 0, 49 y 89. Los sueros de conejos tomados el día 89 se purificaron por cromatografía de afinidad respecto a dicho péptido sintético. Para esto, dicho péptido se acopló a una columna de 1 ml de Hi-Trap-Sepharose según las recomendaciones del fabricante (Amersham-Pharmacia). El suero se diluyó a la mitad en tampón PBS, pH 7,4, y luego se inyectó a razón de 1 ml/minuto en la columna. Después de lavado con PBS, pH 7,4, seguido por elución con mezcla de glicina 50 mM/HCl, pH 3, las fracciones eluidas se neutralizaron inmediatamente y se dializaron contra PBS 0,15 M, pH 7,4.

30 4. Producción y acoplamiento de fragmentos de anticuerpos

Se llevó a cabo la digestión de los anticuerpos policlonales anti-LukS 173/89 y 176/89 con pepsina fijada sobre agarosa durante 1 hora 30 minutos, a pH 3,5 a 37°C para eliminar su fragmento Fc y obtener así los fragmentos F(ab')₂.

35 Se marcaron estos fragmentos con peroxidasa como sigue: los fragmentos F(ab')₂ se dializaron contra tampón de carbonato, pH 9,6, y se acoplaron a peroxidasa (Roche) previamente oxidada por NaIO₄, 2 horas a 18-25°C con una relación de 1 mol de F(ab')₂ por 2 moles de peroxidasa. El acoplamiento se bloqueó luego por NaBH₄ durante 1 hora a 2-8°C y luego el producto se dializó contra el tampón PBS con conservantes.

40 A continuación se marcaron con biotina como sigue: los fragmentos F(ab')₂ se dializaron contra el tampón de carbonato, pH 8,3, y se acoplaron a biotina-NHS (Roche) durante 1 hora a 18-25°C con una relación de 1 mol de F(ab')₂ por 10 moles de biotina. El acoplamiento se bloqueó por lisina, 20 minutos a 18-25°C, y el producto se dializó contra PBS + azida.

Ejemplo 2: Diagnóstico de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL

1. Preparación de la muestra biológica.

45 Las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* se precultivaron en agar-agar GP (Difco: peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, agar-agar 17 g/l; Sigma: NaCl 5 g/l, glucosa 1 g/l). Después de 18 horas a 37°C, se comprobó la pureza antes de la siembra de algunas colonias (aproximadamente 10⁷ UFC/ml) en 5 ml de medio CCY (Difco: extracto de levadura 30 g/l, casaminoácidos 20 g/l; Sigma: Na₂HPO₄ · 2H₂O 3,11 g/l, KH₂PO₄ 0,41 g/l, ácido pirúvico 23 g/l) en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 25 ml. Después de cultivo durante 18 horas a 37°C con agitación, los líquidos sobrenadantes del cultivo se recogieron después de centrifugación (8000 g, 4°C, 10 minutos), y luego se conservaron durante un corto tiempo a 4°C o a -20°C antes de su utilización.

Cada cepa recibió un código de identificación (A o LY seguido por 6 números) y se denominó "+" si se producía PVL o "-" si no se producía.

2. Ensayo ELISA

5 Los pocillos de placas ELISA (Greiner, 100 µl/pocillo) fueron revestidos con anti-LukS 18A4E10 por incubación con una solución de este anticuerpo diluido en PBS (PBS Sigma, pH 7,4; azida de sodio al 0,1%) a 10 µg/ml durante 18 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). Después de 5 lavados con tampón PBS-Tween 20 (aparato ImmunoWash 1575 Biorad), la placa se saturó con una solución de PBS-Tween (0,05%) - 10% de leche - 0,5% de BSA (Sigma) durante 2 horas a temperatura ambiente (150 µl/pocillo).

Después de 5 lavados con PBS-Tween (0,05%), los líquidos sobrenadantes de cultivo se incubaron durante 75 minutos a 37°C.

10 Después de 5 lavados con PBS-Tween (0,05%), la solución de anticuerpos de conejo 176-89, fragmento F(ab')₂ marcado con peroxidasa, diluido 1/100 en PBS-Tween - 5% de leche, se incubó durante 75 minutos a 37°C. Después de 5 lavados con PBS-Tween se añadieron 75 µl solución de TMB (sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) y la placa se incubó durante 30 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo mediante la adición de 75 µl de H₂SO₄ 1N. La lectura de las placas (DO) se realizó a 450 nm con un lector *MicroPlaqué Reader* 680 (Biorad).

3. Resultados

15 Los resultados se presentan en la Figura 1 que es un gráfico que muestra la DO de cada cepa.

Los resultados muestran que, entre las 15 cepas PVL+, 12 cepas se detectan bien y que, entre las 14 cepas PVL-, se observaron 3 resultados positivos falsos.

Estos resultados muestran claramente que se pueden diferenciar las cepas PVL+ de las cepas PVL-, con ayuda de un de inmunoensayo de rutina, pero que dicho ensayo carece de especificidad.

20 **Ejemplo 3: Diagnóstico de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL después del tratamiento previo de la muestra biológica por calentamiento**

1. Tratamiento de la muestra

25 Se procedió al tratamiento por calentamiento a 95°C de muestras biológicas, tales como las preparadas en el Ejemplo 2, durante tiempos que varían de 10 a 30 minutos y se determinó su DO según el protocolo descrito en el Ejemplo 2.

Los resultados de DO se dan en la Tabla 1 a continuación que muestra que se obtiene una desnaturalización de la PVL después de 10 minutos de tratamiento.

Tabla 1

Nº de las cepas	PVL	Sin calentamiento	Calentamiento de 10 minutos	Calentamiento de 20 minutos	Calentamiento de 30 minutos
LY990179	+	0,839	2,126	2,76	>3
A960420	+	1,73	2,844	>3	>3
A990438	-	1,545	0,852	0,25	0
A980642	+	0,458	1,364	2,325	>3
LY990301	-	2,123	0,105	0	0
HT20020275	+	0,729	2,269	>3	>3
LY990333	-	0,615	0,202	0	0
HT20040540	+	1,178	>3	>3	>3

30 2. Ensayo ELISA

Se repitió el modo operativo descrito en el Ejemplo 2, punto 2 anterior, excepto que se utilizaron los líquidos sobrenadantes de cultivo de 29 cepas (15 PVL+ y 14 PVL-) previamente tratados a 95°C durante 1 hora.

3. Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 2 que es un gráfico que da la DO de cada cepa.

35 Los resultados muestran que todas las cepas PVL+ se identifican por el procedimiento de la invención con un nivel de DO suficientemente alto como para hacer una distinción con las cepas PVL-.

El tratamiento previo permite, por lo tanto, mejorar la especificidad del procedimiento de la invención.

Ejemplo 4: Diagnóstico de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL después del tratamiento previo de la muestra biológica por varios tipos de tratamiento de desnaturalización

1. Tratamiento de la muestra

5 Se utilizaron tres cepas clínicas PVL+ (LY990084, A92007, LUG855) y tres cepas clínicas PVL- (LY990333, LY991321, RN6911), las cuales se sometieron a los tratamientos siguientes:

- ausencia de tratamiento (0),
- desnaturalización por calentamiento a 95°C durante 1 hora (1),
- desnaturalización por ácido KH₂PO₄ 0,1 M final durante 30 minutos con vórtice, y luego neutralización mediante la adición de NaOH (2),
- 10 - desnaturalización mixta por ácido KH₂PO₄ 0,1 M final durante 10 minutos con vórtice y, luego ebullición durante 10 minutos a 95°C, seguido por neutralización con NaOH (3).

2. Ensayo ELISA

15 Se repitió el modo operativo descrito en el Ejemplo 2, excepto que se utilizaron las cepas tratadas previamente según el punto 1 anterior y una solución de anticuerpos de conejo 176-89, fragmento F(ab')₂ marcado con peroxidasa, diluido 1/1000 en tampón PBS-Tween - 5% de leche.

3. Resultados

Los resultados se presentan en la Figura 3 que es un gráfico que muestra la DO de cada cepa.

Los resultados muestran que todas las cepas PVL- tenían valores de la DO comprendidos entre 0,09 y 0,181, independientemente del tratamiento de la muestra.

20 Para las cepas PVL+, los valores de la DO son más altos que los de las cepas PVL- después del tratamiento. El aumento de la DO obtenido por tratamiento químico, tratamiento térmico y por combinación de los dos es estadísticamente significativo (p = 0,024, p <0,001, p = 0,018, respectivamente), aunque el tratamiento térmico aparece en estas condiciones el más eficiente.

El tratamiento previo permite, por lo tanto, mejorar la especificidad de un inmunoensayo de rutina.

25 Ejemplo 5: Demostración de la detección temprana de bacterias *Staphylococcus aureus* productoras de PVL por utilización del procedimiento de la invención

1. Preparación de la muestra biológica

30 Se cultivaron previamente cuatro cepas clínicas de *S. aureus* (2 cepas PVL+ y 2 cepas PVL-) según el modo operativo descrito en el Ejemplo 2. Las colonias se utilizaron para realizar una siembra rica de 5 ml de medio CCY en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 25 ml. El medio de cultivo se recogió inmediatamente después de la inoculación, y luego, sucesivamente, 1h, 2h, 3h y 18h después de incubación a 37°C con agitación. Después de centrifugación (8000 g, 4°C, 10 minutos) se recuperaron los líquidos sobrenadantes de cultivo y luego se conservaron durante un corto período de tiempo a 4°C o a -20°C antes de su uso. Las muestras se trataron por calentamiento como se ha descrito en el Ejemplo 3.

35 2. Ensayo ELISA

Se repitió el modo operativo descrito en el Ejemplo 2, punto 2 anterior, excepto que se utilizaron los líquidos sobrenadantes de cultivo de cepas previamente tratadas como se ha descrito en el punto 1 anterior.

3. Resultados

40 Los resultados de DO se presentan en la Tabla 2 que muestra que la PVL puede ser detectada muy rápidamente con el procedimiento de la invención (detección clara a las 2 horas del cultivo).

Tabla 2

Nº de las cepas		Tiempo de cultivo				
		T 0	T 1 hora	T 2 horas	T 3 horas	T 18 horas
A890097	PVL+	0,161	1,116	>3	>3	>3
A920007	PVL+	0,083	0,975	2,57	>3	>3
LY990301	PVL-	0	0	0	0	0
LY990333	PVL-	0	0	0	0	0

Ejemplo 6: Demostración de la detección temprana de la PVL en muestras biológicas por utilización del procedimiento de la invención**1. Preparación de la muestra biológica**

5 Las muestras clínicas son aspirados broncopulmonares, líquidos bronco-alveolares y pus de abscesos cutáneos o de supuración profunda de pacientes que presentan infecciones por *S. aureus*, ya sea por cepas PVL+ o por cepas PVL-. Estas muestras se conservaron a -20°C antes del análisis por utilización del procedimiento de la invención. Después de descongelación a temperatura ambiente, las muestras se homogeneizaron por agitación con vórtice durante 15 minutos. Después de centrifugación (10 minutos a 4000 rpm a 15°C), el líquido sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf, y luego se desnaturalizó durante 1 hora a 95°C.

10 Para muestras muy viscosas estas se diluyeron primeramente al doble con tampón PBS, pH 7,4, y luego se agitaron con vórtice durante 15 minutos. Después de centrifugación (10 minutos a 4000 rpm a 15°C), el líquido sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf, y luego se desnaturalizó durante 1 hora a 95°C.

15 En caso de líquido sobrenadante viscoso, se diluyó al doble con n-heptano (Merck) y se agitó de nuevo con vórtice durante 10 minutos. Después de centrifugación (10 minutos a 4000 rpm a 15°C), se eliminó completamente la fase superior que correspondía al n-heptano y la fase inferior se transfirió a otro tubo Eppendorf para ser desnaturalizada durante 1 hora a 95°C.

2. Ensayo ELISA

20 Se repitió el modo operativo descrito en el Ejemplo 2, punto 2 anterior, excepto que se utilizaron las muestras biológicas tratadas como se ha descrito en el punto 1 anterior.

3. Resultados

25 Los resultados de la valoración de la PVL se dan en las Tablas 3 y 4 que muestran que la PVL puede ser detectada directamente en muestras biológicas, independientemente de la sensibilidad de la cepa a la meticilina, y que no existen positivos falsos (en ninguna muestra con cepas PVL- se detecta la PVL). Además, el tratamiento previo de la muestra por n-heptano no altera la detección de la PVL.

Tabla 3

Muestra	Tipo de muestra	Tratamiento previo	Cepa*	Cantidad de PVL (µg/ml)
17	Lavado bronco alveolar	no	PVL+	<0,05
13	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
18	Minilavado bronco alveolar	no	PVL-	<0,05
22	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
11	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
8	Aspiración bronquial	PBS + n-Heptano	PVL-	<0,05
16	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
10	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
19	Escupitajo	no	PVL-	<0,05
14	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
15	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
12	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
7	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
5	Aspiración bronquial	no	PVL-	<0,05
23	Líquido articular	no	PVL-	<0,05
20	Líquido peritoneal	no	PVL-	<0,05
4	Líquido de drenaje	no	PVL+	<0,05
2	Absceso	no	PVL+	1
3	Absceso	no	PVL-	<0,05
1	Líquido de drenaje	no	PVL-	<0,05
5	Aspiración bronquial	PBS	PVL+	1,2
5	Aspiración bronquial	PBS+ n-Heptano	PVL+	1,2
6	Aspiración bronquial	PBS+ n-Heptano	PVL+	1,2

*La pertenencia a PVL- o PVL+ se puso de manifiesto por la detección de la presencia por PCR de los genes LukS-PV y LukF-PV que codifican la PVL en el seno de aislados de *S. aureus* por los métodos descritos por Vadenesch et al²

Tabla 4

	Muestra	Cepa*	Concentración de	Detección del gen
Pneumonía	Lavado broncoalveolar	PVL+	0,99	0
	Lavado broncoalveolar	PVL+	1,07	0
	Lavado broncoalveolar	PVL+	20,18	0
	Escupitajo	PVL-	0,00	1
	Escupitajo	PVL-	0,00	1
	Lavado broncoalveolar	PVL-	0,00	1
	Escupitajo	PVL-	0,00	1
	Lavado broncoalveolar	PVL-	0,00	ND
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	0
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	0
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	0
	Lavado broncoalveolar	PVL-	0,00	0
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	1
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	0
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	1
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	0
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	0
	Escupitajo	PVL-	0,00	0
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	0
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	0
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	ND
	Aspirado bronquial	PVL-	0,00	1
Aspirado bronquial	PVL-	0,00	0	
Infección de la piel	Absceso	PVL+	>1	0
	Absceso	PVL+	0,42	0
	Absceso	PVL+	>1	1
	Absceso	PVL+	>1	0
	Absceso	PVL+	1,20	0
	Absceso	PVL+	1,00	0
	Absceso	PVL+	1,30	0
	Absceso	PVL+	1,50	1
	Absceso	PVL+	1,82	0
	Absceso	PVL+	>2	0
	Absceso	PVL+	0,92	0
	Absceso	PVL+	>2	0
	Absceso	PVL+	0,27	0
	Absceso	PVL+	>2	0
Absceso	PVL+	1,72	0	

Tabla 4 (continuación)

	Muestra	Cepa *	Concentración de	Detección del gen
Infección de la piel	Absceso	PVL+	1,41	0***
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	1
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	1
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0
	Absceso	PVL-	0,00	0

*La pertenencia a PVL- o PVL+ se puso de manifiesto por la detección de la presencia por PCR de los genes LukS-PV y LukF-PV que codifican la PVL en el seno de aislados de *S. aureus* según los métodos descritos por Vadenesch et al².

** La detección del gen mecA que codifica la resistencia a la metilina en el seno de aislados de *S. aureus* se realizó

Bibliografía

- 1 : Ward PD, Turner WD, 1980, Infect. Immun., 28(2) : 393-397
- 2 : Vadenesch et al., 2003, Emerg Infect Dis, 9(8) : 978-984
- 3 : Dufour P et al., 2002, Clin Infect Dis , 35 : 819-824
- 4 : Cribier B et al, 1992, Dermatology, 185 : 175-185
- 5 : Freney J et al., 2000, Précis de Bactériologie Clinique, 40 : 298 et 793-794
- 6 : J. Histochem. Cytochem. 45 : 481-491, 1997
- 7 : Labandeira-Rey M et al, 2007, Science, 315: 1130-1133

LISTA DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Université Claude Bernard Lyon 1

5 <120> Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de PVL.

<130> PVL STAPH

<160> 4

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 309

15 <212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 1

Met Ser Gly Ser His His His His His His Ser Ser Gly Ile Glu Gly
1 5 10 15

Arg Gly Arg Leu Ile Lys Ser Lys Ala Asp Asn Asn Ile Glu Asn Ile
20 25 30

Gly Asp Gly Ala Glu Val Val Lys Arg Thr Glu Asp Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys
50 55 60

Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn
65 70 75 80

Ser Lys Thr Thr Tyr Tyr Asn Tyr Lys Asn Thr Asp His Ile Lys Ala
85 90 95

Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu Lys Thr Asn Asp Pro
100 105 110

Asn Val Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn Lys Ile Asp Ser Val
115 120 125

Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Asn Ser
130 135 140

Gly Pro Ser Thr Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Ile Ser Glu Val Glu His Gln Asn Ser
165 170 175

ES 2 398 412 T3

Lys Ser Val Gln Trp Gly Ile Lys Ala Asn Ser Phe Ile Thr Ser Leu
 180 185 190

Gly Lys Met Ser Gly His Asp Pro Asn Leu Phe Val Gly Tyr Lys Pro
 195 200 205

Tyr Ser Gln Asn Pro Arg Asp Tyr Phe Val Pro Asp Asn Glu Leu Pro
 210 215 220

Pro Leu Val His Ser Gly Phe Asn Pro Ser Phe Ile Ala Thr Val Ser
 225 230 235 240

His Glu Lys Gly Ser Gly Asp Thr Ser Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly
 245 250 255

Arg Asn Met Asp Val Thr His Ala Thr Arg Arg Thr Thr His Tyr Gly
 260 265 270

Asn Ser Tyr Leu Glu Gly Ser Arg Ile His Asn Ala Phe Val Asn Arg
 275 280 285

Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu Ile Lys
 290 295 300

Val Lys Gly His Asn
 305

- <210> 2
- 5 <211> 323
- <212> PRT
- <213> Staphylococcus aureus

<400> 2

ES 2 398 412 T3

Met Ser Gly Ser His His His His His His Ser Ser Gly Ile Glu Gly
 1 5 10 15

Arg Gly Arg Leu Ile Lys Ala Gln His Ile Thr Pro Val Ser Glu Lys
 20 25 30

Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala Thr Ser Asp
 35 40 45

Ser Asp Lys Leu Lys Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn Phe Ile Lys
 50 55 60

Asp Lys Ser Tyr Asp Lys Asp Thr Leu Ile Leu Lys Ala Ala Gly Asn
 65 70 75 80

Ile Tyr Ser Gly Tyr Thr Lys Pro Asn Pro Lys Asp Thr Ile Ser Ser

ES 2 398 412 T3

				85						90				95			
Gln	Phe	Tyr	Trp	Gly	Ser	Lys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Ile	Asn	Ser	Asp	Ser		
			100					105						110			
Asn	Asp	Ser	Val	Asn	Val	Val	Asp	Tyr	Ala	Pro	Lys	Asn	Gln	Asn	Glu		
		115					120					125					
Glu	Phe	Gln	Val	Gln	Gln	Thr	Val	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Gly	Asp	Ile		
	130					135					140						
Asn	Ile	Ser	Asn	Gly	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Ser	Lys	Ser	Phe		
145					150					155					160		
Ser	Glu	Thr	Ile	Asn	Tyr	Lys	Gln	Glu	Ser	Tyr	Arg	Thr	Ser	Leu	Asp		
				165					170						175		
Lys	Arg	Thr	Asn	Phe	Lys	Lys	Ile	Gly	Trp	Asp	Val	Glu	Ala	His	Lys		
			180					185					190				
Ile	Met	Asn	Asn	Gly	Trp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ser	Tyr	His	Ser		
		195					200					205					
Thr	Tyr	Gly	Asn	Glu	Met	Phe	Leu	Gly	Ser	Arg	Gln	Ser	Asn	Leu	Asn		
	210					215					220						
Ala	Gly	Gln	Asn	Phe	Leu	Glu	Tyr	His	Lys	Met	Pro	Val	Leu	Ser	Arg		
225					230					235							240
Gly	Asn	Phe	Asn	Pro	Glu	Phe	Ile	Gly	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Gln	Asn		
				245					250					255			
Ala	Ala	Lys	Lys	Ser	Lys	Ile	Thr	Val	Thr	Tyr	Gln	Arg	Glu	Met	Asp		
			260					265					270				
Arg	Tyr	Thr	Asn	Phe	Trp	Asn	Gln	Leu	His	Trp	Ile	Gly	Asn	Asn	Tyr		
		275					280					285					
Lys	Asp	Glu	Asn	Arg	Ala	Thr	His	Thr	Ser	Ile	Tyr	Glu	Val	Asp	Trp		
	290					295					300						
Glu	Asn	His	Thr	Val	Lys	Leu	Ile	Asp	Thr	Gln	Ser	Lys	Glu	Lys	Asn		
305					310					315					320		
Pro	Met	Ser															

ES 2 398 412 T3

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 3

Cys Ser Gly His Asp Pro Asn Leu Phe Val Gly Tyr Lys Pro Tyr Ser
1 5 10 15

Gln Asn

10

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

15

<400> 4

Cys Asn Phe Asn Trp Ile Gly Asn Asn Tyr Lys Asp Glu Asn Arg Ala
1 5 10 15

Thr His Thr Ser
20

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de la leucocidina de Panton-Valentine (PVL) a partir de una muestra biológica obtenida de un individuo propenso a ser colonizado o infectado por *Staphylococcus aureus*, realizándose el diagnóstico por detección de la PVL por un inmunoensayo de rutina, caracterizado porque dicha muestra biológica se trata previamente para desnaturalizar la PVL.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el inmunoensayo de rutina es un método de tipo sándwich.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el inmunoensayo utiliza al menos un anticuerpo monoclonal anti-PVL.
- 10 4. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque el método de tipo sándwich es un ensayo ELISA.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el tratamiento previo consiste en un calentamiento a una temperatura comprendida entre 60 y 100°C, durante un período de al menos 10 minutos.
- 15 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el tratamiento previo consiste en un calentamiento a una temperatura comprendida entre 60 y 100°C y una duración comprendida entre 10 y 30 minutos.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el tratamiento previo consiste en la desnaturalización de la PVL por un ácido.
- 20 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el ácido es KH_2PO_4 .
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque comprende una etapa adicional que consiste en determinar si las *Staphylococcus aureus* presentes en dicha muestra biológica son bacterias resistentes a la metilina (MRSA) o sensibles a metilina (MSSA).

FIGURA 1

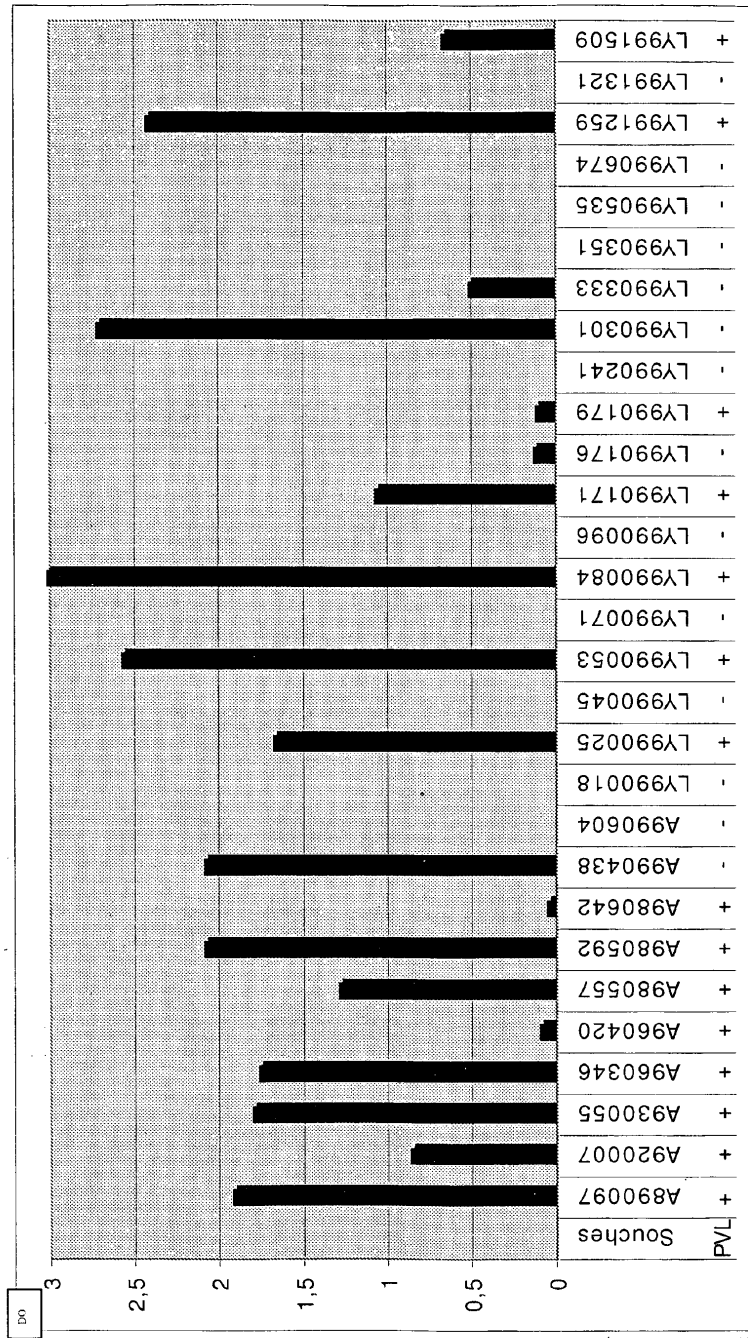


FIGURA 2

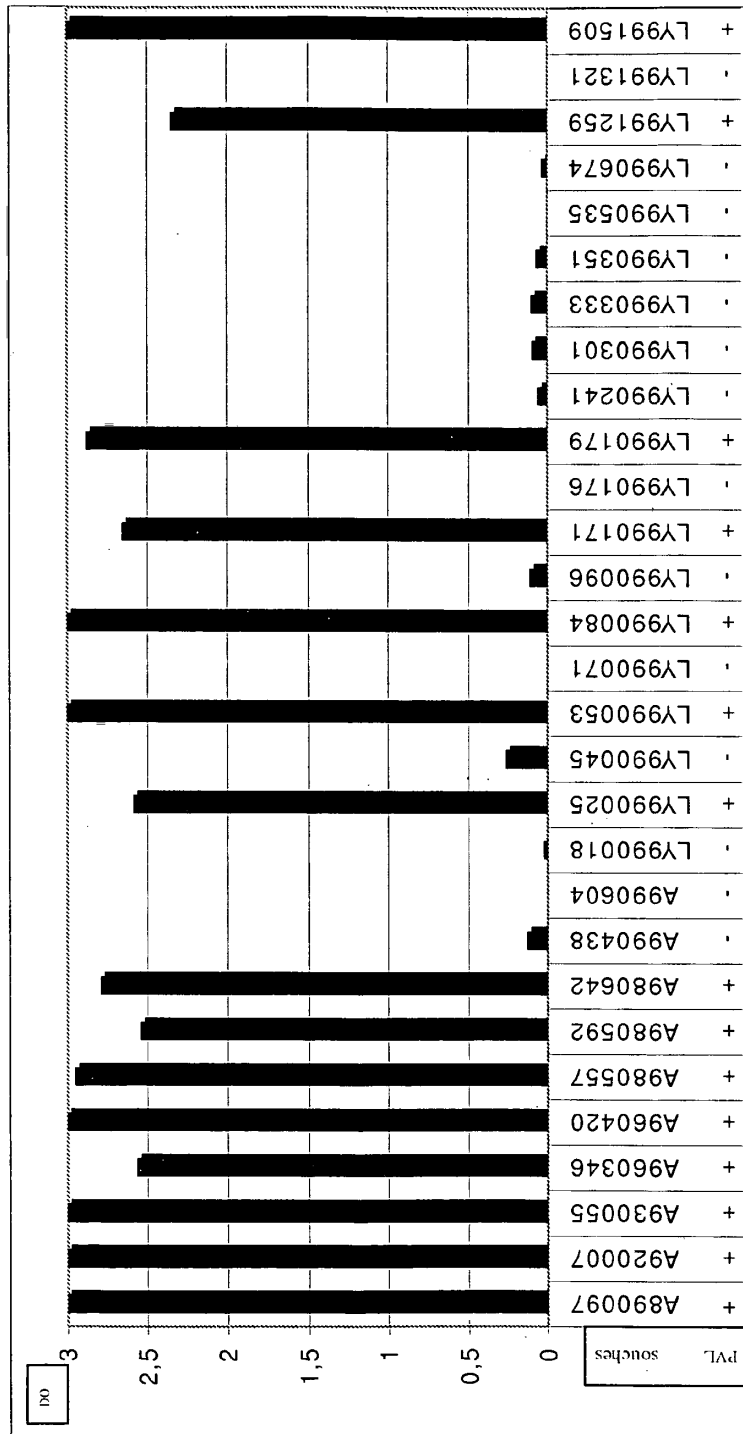


FIGURA 3

