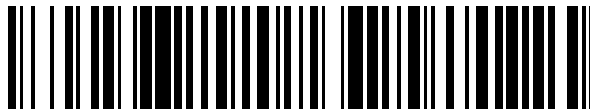


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 714**

21 Número de solicitud: 201230377

51 Int. Cl.:

**G01N 33/551** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 21/47** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**13.03.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**16.10.2013**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070158**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA  
(100.0%)  
Centro de Transferencia Tecnología-UPCT  
Camino de Vera, s/n  
46022 VALENCIA ES**

72 Inventor/es:

**MAQUIEIRA CATALÀ, Angel;  
MORAIS EZQUERRO, Sergi Beñat;  
PUCHADES PLÀ, Rosa y  
TORTAJADA GENARO, Luis Antonio**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **MÉTODO PARA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS Y VIRUS SIN MARCAJE BASADO EN  
TECNOLOGÍA DE DISCO COMPACTO**

57 Resumen:

La presente invención comprende una metodología de análisis rápido para la identificación y detección sin marcaje de virus y/o bacterias Gram + y Gram -, resistentes o no a antibióticos, utilizando como soporte discos audio-video (CD, DVD, BD, Lightscribe, Superdisk, etc.) donde inmovilizar receptores moleculares específicos de biomoléculas presentes en la superficie de las bacterias y/o virus, empleando como detector un lector/grabador de discos (CD, DVD, BD, Lightscribe, etc.). La invención comprende tres procesos principales: resuspensión de virus y/o bacterias, incubación en el disco, y detección sin marcaje empleando un lector/grabador de discos compactos (CD, DVD, BD, etc.) La presente invención ha sido diseñada para identificar receptores o bioreceptores inmovilizados separados en la cara de policarbonato del disco y en posiciones conocidas y ordenadas, formando una micromatriz. Los bioreceptores específicos de biomoléculas presentes en la superficie de virus y/o bacterias pueden ser por ejemplo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

ES 2 425 714 A1

**MÉTODO PARA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS Y VIRUS SIN MARCAJE BASADO EN TECNOLOGÍA DE DISCO COMPACTO.**

**DESCRIPCIÓN**

5

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

10 La presente invención se centra en el sector de la biotecnología, en concreto en el análisis para la identificación y detección de bacterias y/o virus sin marcaje. Las principales aplicaciones de la invención ocurren en la vigilancia epidemiológica, control de calidad de agua y aire, y en general cualquier área que implique la detección de bacterias mediante interacciones bioespecíficas basadas en la utilización de receptores moleculares separados y ordenados sobre un soporte.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La tecnología de detección y/o identificación de bacterias y virus utilizando discos ópticos como soportes, y lectores/grabadores de discos como detectores es conocida en el estado de la técnica.

20 ES2288429B2 (Universidad Politécnica de Valencia, 2006) describe un método de modificación química de un disco compacto, destinado como soporte para la inmovilización covalente de biomoléculas, manteniendo al máximo las propiedades ópticas y mecánicas del disco compacto. La inmovilización covalente de las biomoléculas se realiza en un orden y disposición establecidos constituyendo un array o microarray sobre la superficie polimérica del disco compacto. Los enlaces covalentes del método descrito en ES2288429B2, en la  
25 mayoría de los casos son irreversibles. El enlace covalente es más perdurable en el tiempo comparado con las interacciones electrostáticas así como las interacciones hidrófilas/hidrófobas, permitiendo que el tipo de unión de las biomoléculas a la superficie polimérica sea más fuerte para resistir mejor los lavados. Las biomoléculas se encuentran marcadas para su detección directa o indirecta mediante la conjugación con un fluorocromo o con una enzima.

30

EP1324042A2 (José Reclame, 2001) describe un método para la detección y/o cuantificación de moléculas ancladas a moléculas de captura que se encuentran fijadas en la superficie de un disco compacto mediante costosos y complicados medios. El método descrito permite realizar lecturas y/o detecciones biológicas en una cara del disco mientras que en la otra se pueden efectuar lecturas o grabaciones de las señales de  
35 fluorescencia obtenidas.

35

ES2304093A1 (Universidad Politécnica de Valencia, 2006) describe un sistema integrado de almacenamiento de datos para análisis químico de muestras y para detección y almacenamiento de los resultados analíticos. El sistema descrito es capaz de capturar los resultados analíticos obtenidos en una cara de un disco de  
40 almacenamiento de datos y obtener su transposición en datos digitales para su posterior procesamiento y/o grabado en la otra cara del disco. El sistema comprende un disco compacto (CD/DVD) como soporte así como un lector/grabador de CD/DVD para la detección de las señales de fluorescencia.

40

Existe un creciente interés por los métodos de caracterización de moléculas mediante técnicas sin marcaje (label-free). Habitualmente el proceso de detección o reconocimiento de moléculas se realiza mediante técnicas que requieren elementos de marcado tales como colorantes fluorescentes, enzimas, isótopos radioactivos, etc. Sin embargo, los protocolos asociados al proceso de marcaje de estas moléculas para su  
45 detección implican mayor tiempo y mayor coste económico. Por ello se espera que los sistemas de detección e identificación de moléculas sin marcado crezcan en importancia en sectores como el clínico, biofarmacéutico, medioambiental, seguridad, entre otros debido a su sencillez, sensibilidad, ahorro de reactivos y analitos, y en definitiva, menor coste por detección.

45

50

US2007/0026382A1 (ALIX YALE & RISTAS LLP, 2006) describe un método alternativo a la citometría de flujo para detección de fenotipos y determinación de respuestas funcionales en las células, basado en una  
55 tecnología sin marcaje, sobre una superficie biosensible, que puede ser un chip o una placa (biosensor chip), de manera preferente recubierta de oro. La superficie biosensible descrita comprende un array de ligandos de captura específica para marcadores de la superficie celular de manera que un fenotipo específico se correlaciona con una localización de interacción específica sobre el chip. El tipo de células que se puede analizar incluye células animales, vegetales y bacterias. La lectura de la interacción entre las células y los  
60 ligandos de captura específica se realiza mediante una cámara CCD o una cámara CMOS.

55

60

A pesar de los diferentes procedimientos descritos en el estado de la técnica, actualmente existe la necesidad de desarrollar un método de análisis rápido sin marcaje para la identificación y detección de bacterias y virus, basado en tecnologías de disco compacto.

65

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCÓN**

La presente invención comprende una metodología de análisis rápido para la identificación y detección sin marcaje de virus y bacterias Gram + y Gram –, resistentes o no a antibióticos, utilizando como soporte discos audio-video (CD, DVD, BD, Lightscribe, Superdisk, etc.) donde inmovilizar receptores moleculares específicos de biomoléculas presentes en la superficie de las bacterias y/o virus, empleando como detector un lector/grabador de discos (CD, DVD, BD, Lightscribe, etc.). La presente invención ha sido diseñada para identificar receptores o bioreceptores inmovilizados separados en la cara de policarbonato del disco y en posiciones conocidas y ordenadas, formando una micromatriz. Los bioreceptores específicos de biomoléculas presentes en la superficie de virus y/o bacterias pueden ser por ejemplo polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

Como realización preferente, la presente invención se ha aplicado en la identificación y detección sin marcaje de una suspensión de neumococos (*Streptococcus pneumoniae*) previamente aislada de una muestra clínica y crecida en medio sólidos, así como de una suspensión de *Escherichia coli* y de *Salmonella spp.* Para ello, la invención se ha diseñado para identificar polisacáridos específicos presentes en la superficie de dichas bacterias, utilizando microarrays de antisueros.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN**

De manera general, el método de identificación y/o detección de virus y/o bacterias objeto de la presente invención comprende las siguientes etapas esenciales:

- resuspensión de las bacterias y/o los virus contenidos en la muestra problema,
- incubación en disco compacto, y
- detección sin marcaje empleando un lector/grabador de discos.

*Resuspensión de las bacterias y/o los virus contenidos en la muestra problema*

Se parte de una muestra problema (a partir de ahora "muestra") ya obtenida, por ejemplo una muestra clínica, recogida por ejemplo en una placa tipo *Petri* y previamente incubada en un medio sólido (por ejemplo en agar-sangre, agar chocolate, etc.), durante un tiempo suficiente para que las bacterias y/o los virus allí contenidos crezcan en abundancia ( $10^0$ - $10^5$ ) sobre la superficie de la placa (por ejemplo 16-24 h), hasta formar colonias.

Las muestras a analizar con la invención pueden ser aislamientos microbianos de origen diverso como sangre (hemocultivo), líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, orina, secreción lacrimal, etc.

La resuspensión del material de las colonias de bacterias y/o virus de la muestra se realiza por ejemplo mediante un asa de siembra de 1  $\mu$ L que se pasa por la superficie del medio sólido, para añadirse por ejemplo a un tubo de 1,5 mL que contiene un volumen adecuado (por ejemplo entre 100-500  $\mu$ L) de una disolución acuosa tamponada (por ejemplo PBST, TBS-T, etc.) la cual se caracteriza por ser compatible con la suspensión de bacterias y/o virus para su posterior incubación en el disco.

Se obtiene una suspensión de bacterias y/o virus que preferiblemente se homogeneiza antes del siguiente paso para eliminar posibles agregados y así facilitar las interacciones con los receptores inmovilizados en la superficie del disco compacto.

*Incubación en el disco compacto*

Se parte de un disco compacto (de ahora en adelante "disco") en cuya cara de policarbonato se han inmovilizado receptores moleculares localizados en la superficie de las bacterias y/o virus, quedando dispuestos en posiciones conocidas y ordenadas, formando una micromatriz. Estos receptores permiten identificar biomoléculas de la superficie del virus y/o la bacteria, tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, o polisacáridos.

A este paso se lo denomina impresión de micromatrices sobre el disco. La inmovilización de los receptores en el disco se puede realizar mediante diferentes métodos (Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques. 2<sup>th</sup> Edition. Academic Press, San Diego, CA. 2008), de manera preferente pero no limitante, en una realización preferente de la presente invención se realiza mediante la inmovilización de anticuerpos contenidos en antisueros mediante adsorción en disco, tal y como se describe más adelante.

Independientemente del método de inmovilización empleado, la superficie del disco con los receptores inmovilizados debe mantener las propiedades ópticas y mecánicas del disco, aspecto clave para su lectura mediante el lector/grabador de discos del siguiente paso.

El disco está segmentado en áreas independientes (por ejemplo entre 6-12), cada una de las cuales se puede utilizar para analizar muestras distintas o réplicas de una misma muestra. Cada disco puede contener impresos por ejemplo entre 50 y 200 puntos o "spots" entre los que se encuentran los receptores inmovilizados (específicos, controles, y réplicas) para determinar con exactitud cada uno de los tipo, factor y/o grupo de bacterias y/o virus.

La suspensión de bacterias y/o virus obtenida en el paso anterior se incuba durante por ejemplo 15 minutos, en el disco con los receptores previamente inmovilizados.

10 Durante la incubación, el receptor fija la bacteria y/o el virus en una posición concreta y separada que define su tipo, y/o su factor y/o su grupo.

Para eliminar las bacterias y/o los virus que no se han fijado específicamente en el disco, se puede realizar un lavado y un secado, por ejemplo lavando el disco con agua y centrifugándolo para secarlo rápidamente.

15 *Detección de bacterias y/o virus en el disco*

Por último, se realiza una lectura del disco con un lector/grabador de discos compactos, que utiliza el láser del propio grabador como haz interrogante y el fotodiodo propio del cabezal pickup como elemento detector. La interacción específica receptor/bacteria y/o virus produce un precipitado que absorbe y dispersa el haz de luz del láser, atenuando la intensidad de señal reflejada que detecta el fotodiodo del cabezal pickup. La disminución de señal de reflexión se relaciona directamente con la interacción receptor/bacteria y/o virus. Dependiendo del tipo de disco, velocidad de lectura, y posición de la matriz, la superficie del disco se lee o escanea en pocos minutos (por ejemplo 1-8 min).

25 Una vez finalizado el escaneado del disco, se observa la imagen obtenida en la pantalla del ordenador, pudiendo variar el brillo y el contraste, con el fin de facilitar la interpretación de los datos. La detección se puede hacer visualmente, ayudándose de una plantilla que indica la localización de cada receptor y de una tabla en la que se encuentran las diferentes combinaciones de señales positivas de los receptores, indicándose también a qué tipo y/o grupo de bacteria y/o virus corresponden dichas señales. Con esta información se determina exactamente el grupo y/o tipo de bacteria y/o virus en función de la relación señal ruido obtenida de los análisis simultáneos de por ejemplo más de una muestra.

35 La lectura del disco comprende dos tipos de datos:

1. Datos obtenidos de los puntos o *spots* de control positivo que sirven para fijar la plantilla de interpretación. Se trata de puntos con receptores impresos directamente en el disco que dan señal positiva.

40 2. Datos obtenidos a partir de los puntos o *spots* impresos dentro de un área determinada donde se han inmovilizado receptores que unen la bacteria y/o el virus, y que como consecuencia absorben y dispersan la luz del láser, atenuando la señal de reflexión detectada por el cabezal pickup. En este patrón, cada área puede estar formada por receptores diferentes con, por ejemplo, 3-6 réplicas de cada uno.

45 Alternativamente, las bacterias y/o virus pueden teñirse previa o posteriormente a la incubación en el disco mediante técnicas de tinción descritas para ello (por ejemplo tinción Gram + para la detección de bacterias), aumentando así la relación señal ruido.

50 El principal campo de aplicación de la presente invención es la vigilancia epidemiológica, control de calidad de agua y aire, y en general cualquier área que implique la detección de bacterias mediante interacciones biospecíficas basadas en la utilización de receptores moleculares separados y ordenados sobre un soporte.

Por tanto, la presente invención hace referencia a un método para identificar y/o detectar sin marcaje el tipo y/o grupo de al menos un virus y/o una bacteria previamente aislada (de al menos una muestra) e incubada en un medio sólido, caracterizado por comprender los siguientes pasos esenciales:

- 55 a) resuspender el virus y/o bacteria en una disolución acuosa tamponada, obteniendo una suspensión del virus y/o bacteria;
- b) inmovilizar al menos un receptor de una molécula de la superficie del virus y/o bacteria, formando una micromatriz en un disco compacto como soporte;
- 60 c) incubar la suspensión obtenida en el paso a) en el disco compacto obtenido en el paso b),
- d) detectar el virus y/o bacteria en el disco compacto mediante la lectura del disco con un lector/grabador de discos compactos como detector, obteniendo una relación señal ruido; y
- e) determinar el tipo y/o grupo del virus y/o bacteria en función de la relación señal ruido obtenida en el paso d).

65 De manera preferente, antes o después del paso c) definido anteriormente el método puede comprender el siguiente paso adicional:

- f) teñir el virus y/o bacteria para amplificar la relación señal ruido obtenida en el paso d), mediante una técnica de las que se conocen en el estado de la técnica.

5 Así mismo, en una realización preferente, el método descrito anteriormente se caracteriza por que la muestra se selecciona de entre el siguiente grupo: sangre (hemocultivo), líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, orina, y secreción lacrimal.

10 En otra realización preferente, el método descrito anteriormente se caracteriza por que la micromatriz del paso b) se inmoviliza en la cara de policarbonato del disco manteniendo las propiedades ópticas y mecánicas del disco.

15 En otra realización preferente, el método descrito anteriormente se caracteriza por que la micromatriz del paso b) comprende entre 50 - 200 puntos que comprenden al menos un receptor de una molécula de la superficie del virus y/o bacteria y al menos un punto como control positivo. Más preferentemente, los puntos tienen al menos entre 0,3-0,5 mm de diámetro y están separados al menos 1,0 mm.

20 En otra realización preferente, el método descrito anteriormente se caracteriza por que el lector/grabador de discos compactos definido en el paso d) utiliza el láser del propio grabador como haz de luz interrogante y el fotodiodo propio del cabezal pickup como elemento detector. Más preferentemente, el haz de luz del láser es absorbido y dispersado por al menos un precipitado producido por la interacción específica del receptor con el virus y/o bacteria, disminuyendo la intensidad de la señal de reflexión que detecta el fotodiodo del cabezal pickup. Aún más preferentemente, la disminución de señal de reflexión se relaciona directamente con la interacción específica del receptor con el virus y/o bacteria.

25 En otra realización preferente, el método descrito anteriormente se caracteriza por que la determinación del tipo y/o grupo del virus y/o bacteria definida en el paso e) se realiza visualmente con una plantilla que indica la localización del receptor y de una tabla en la que se encuentran las diferentes combinaciones de señales positivas del receptor, indicándose también a qué tipo y/o grupo de bacteria y/o virus corresponden dichas señales.

30 En otra realización preferente, el método descrito anteriormente se caracteriza por que el paso b) se realiza mediante la inmovilización de anticuerpos contenidos en antiseros mediante adsorción en disco. Más preferentemente, la inmovilización de anticuerpos contenidos en antiseros mediante adsorción en disco comprende los siguientes pasos:

- 35 i) imprimir el disco con al menos una disolución de antisuero en presencia de un tampón de impresión (como por ejemplo una disolución acuosa de carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,5),  
 ii) incubar al menos a 4 °C durante un periodo de tiempo de al menos 16 horas,  
 iii) lavar con agua y secar el disco por centrifugación.

40 Aún más preferentemente, la disolución de antisuero del paso i) contiene al menos un anticuerpo del virus y/o bacteria.

45 La presente invención también hace referencia a un método para inmovilizar al menos un receptor de una molécula de la superficie de al menos un virus y/o una bacteria, caracterizado por emplear como soporte un disco compacto, dicho método comprende los siguientes pasos:

- i) imprimir la cara de policarbonato del disco con al menos una disolución de antisuero en presencia de un tampón de impresión,  
 ii) incubar al menos a 4 °C durante un periodo de tiempo de al menos 16 horas, y  
 iii) lavar con agua y secar el disco por centrifugación,

50 donde se mantienen las propiedades ópticas y mecánicas del disco.

55 La presente invención también hace referencia a un disco compacto caracterizado por comprender al menos un receptor inmovilizado de una molécula de la superficie de al menos un virus y/o una bacteria, formando una micromatriz para ser leído por un lector/grabador de discos compactos. Más preferentemente, el disco se obtiene mediante un método que comprende los siguientes pasos:

- i) imprimir la cara de policarbonato del disco con al menos una disolución de antisuero en presencia de un tampón de impresión,  
 ii) incubar al menos a 4 °C durante un periodo de tiempo de al menos 16 horas, y  
 iii) lavar con agua y secar el disco por centrifugación,

60 donde se mantienen las propiedades ópticas y mecánicas del disco.

65 La presente invención también hace referencia al uso del disco definido anteriormente, para identificar y/o detectar sin marcaje el tipo y/o grupo de al menos un virus y/o una bacteria previamente aislada de al menos una muestra e incubada en un medio sólido.

Más preferentemente, dicho uso se caracteriza por que la identificación y/o detección sin marcaje del tipo y/o grupo de al menos un virus y/o una bacteria es para vigilancia epidemiológica.

5 Alternativamente, dicho uso se caracteriza por que la identificación y/o detección sin marcaje del tipo y/o grupo de al menos un virus y/o una bacteria es para control de calidad de agua y/o aire.

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones tal y como aquí se utilizan.

10 En la presente invención el término: "método de análisis rápido", se refiere a un ensayo cuya duración total está comprendida entre 1 y 30 minutos.

15 En la presente invención el término: "detección sin marcaje", se refiere a un ensayo en el que directamente se obtiene la señal producida por la interacción bioreceptor-célula o virus, sin recurrir a un tercera especie, como por ejemplo una sustancia fluorescente, una enzima o una partícula.

20 En la presente invención el término: "virus", se refiere a un organismo de estructura sencilla, compuesto de proteínas y ácidos nucleicos, y capaz de reproducirse solo en el seno de células vivas específicas, utilizando su metabolismo.

En la presente invención el término: "bacterias", se refiere a microorganismos unicelulares procariontes, cuyas diversas especies causan las fermentaciones, enfermedades o putrefacción en los seres vivos o en las materias orgánicas.

25 En la presente invención el término: "disco compacto", se refiere a un soporte digital óptico con forma de disco, utilizado para almacenar cualquier tipo de información (audio, imágenes, vídeo, documentos y otros datos) y con diferentes presentaciones y capacidades en cuanto a tamaño y capacidad y velocidad de almacenamiento y reproducción.

30 En la presente invención el término: "lector/grabador de disco compacto", se refiere al dispositivo óptico capaz de reproducir y o grabar los discos compactos utilizando un láser que le permite leer la información contenida en ellos y grabar o regrabar información.

35 En la presente invención el término: "bioreceptores o receptores", se refiere a moléculas u organizaciones moleculares más complejas, producidas o presentes en las células, capaces de reconocer con gran selectividad y afinidad a otra sustancia. Por ejemplo: anticuerpos, oligonucleotidos, lectinas, lipocalinas, etc. También se entiende como bioreceptores y receptores a sustancias sintéticas o semisintéticas con las características descritas arriba.

40 En la presente invención el término: "biomoléculas", se refiere a la unidad mínima de una sustancia de origen biológico que conserva sus propiedades químicas.

45 En la presente invención el término: "micromatriz", se refiere a matriz de tamaño micrométrico. Se entiende por matriz a un conjunto de números, símbolos, puntos, etc., colocados en una disposición dada (rectángulo, cuadrado, círculo, elipse, etc.), frecuentemente en líneas horizontales y verticales.

En la presente invención el término: "muestra problema", se refiere a la muestra a analizar y que contiene la sustancia o sustancias a identificar y/o determinar.

50 En la presente invención el término: "aislamientos microbianos", se refiere a la separación de los microorganismos o virus del medio en donde se encuentran originalmente.

55 En la presente invención el término: "medio sólido", se refiere a un medio de cultivo de microorganismos de consistencia firme o sólida. Se diferencian de los semi-sólidos (consistencia fluida) y de los líquidos.

En la presente invención el término: "relación señal ruido", se refiere al cociente entre la intensidad de una señal generada en el proceso de medida de un analito y la señal de un blanco (muestra sin analito) o del ruido electrónico.

60 En la presente invención el término: "tipo, factor y grupo de virus y/o bacteria", se refiere a:  
"Tipo": cada uno de los grandes grupos taxonómicos en que se dividen los reinos animal y vegetal, y que, a su vez, se subdividen en clases.

"Factor": antígeno presente en la superficie celular.

"Grupo": conjunto de microorganismos con características genéticas, patogénicas, etc., similares.

65 En la presente invención el término: "vigilancia epidemiológica", se refiere a un sistema de recolección y

evaluación de información sobre eventos médico-epidemiológicos.

En la presente invención el término: "control de calidad de agua y/o aire", se refiere a las acciones tendentes a regular la calidad del aire o del agua dentro de unos estándares.

5

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIGURA 1.** Representación esquemática del sistema detector. Los servomecanismos de guiado del láser y giro del disco mantienen el haz láser enfocado en el camino en espiral del disco, permitiendo su rotación y escaneado. La luz reflejada es transformada en señal analógica eléctrica. Al mismo tiempo, el fotosensor detecta la marca (disparador), comenzando la adquisición de datos. La tarjeta de amplificación/detección (DAB) está integrada en la unidad grabadora. La tarjeta DAQ digitaliza las señales analógicas procedentes del la DAB y las transfiere al ordenador para procesarlas. El lector-grabador de CD se controla mediante un software (BioDisk) y se conecta al ordenador mediante un interfaz USB2.0.

15

20

**FIGURA 2.** Imágenes obtenidas tras la lectura del disco al analizar serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en aislamientos microbianos. El panel I corresponde al resultado de la identificación sin marcaje y el panel II a la respuesta obtenida posterior al proceso de tinción.

25

**FIGURA 3.** Imágenes obtenidas tras la lectura del disco al analizar extractos de serotipos de Salmonella spp. Panel I-V: S. Malmoe 16263.1; S. Typhimurium 15994.3; S. Llandoff; control negativo.

30

**FIGURA 4.** Imágenes obtenidas tras la lectura del disco al analizar extractos de serotipos de E. coli. Panel I-IV: E. coli O157:H7; E. coli O103:H2; E. coli O26:H11; control negativo.

#### EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

35

#### EJEMPLO 1: Identificación de *Streptococcus pneumoniae*

40

En el presente ejemplo o realización preferente dicho método comprende los siguientes pasos:

1. Resuspensión de bacterias
2. Inmovilización de anticuerpos contenidos en antisueros en formato de micromatriz mediante adsorción en disco
3. Incubación en disco compacto
4. Detección y determinación mediante un lector/grabador de discos
5. Amplificación de señal mediante tinción
6. Determinación

45

50

##### *Resuspensión de bacterias*

En el presente ensayo de identificación y detección sin marcaje se parte de una suspensión de neumococos (*Streptococcus pneumoniae*) previamente aislada de una muestra clínica y crecida en medios sólidos. Para ello las bacterias, crecidas previamente en medios sólidos, se recogen y posteriormente se resuspenden en 200 µL de disolución acuosa tamponada (TBS-T).

55

##### *Inmovilización de anticuerpos contenidos en antisueros en formato de micromatriz mediante adsorción en disco*

60

La inmovilización de anticuerpos contenidos en antisueros en formato de micromatriz se realiza preferentemente mediante adsorción, sin ser limitante para la invención. En este ejemplo, el anclaje de la bacteria al receptor se produce a través de la formación de enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, enlaces hidrofóbicos entre el receptor y la superficie. En este caso, los receptores reaccionan con la superficie de las bacterias en disoluciones acuosas tamponadas, siendo el pH de las mismas una variable crítica para obtener una inmovilización estable de los antisueros.

65

En este caso, en la cara de policarbonato de un disco DVD se imprimen seis micromatrices de 144 puntos cada una (12 × 12). Cada matriz contiene puntos de 0,3-0,5 mm de diámetro separados 1,0 mm, dispensando disoluciones de antisuero (20-50 nL), conteniendo los receptores o bioreceptores específicos para detectar e

5 identificar cinco serotipos a nivel de tipo, factor y grupo parcial y puntos utilizados como control positivo. El tampón de impresión es una disolución acuosa de carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,5. Tras la impresión, el disco se deja incubar a 4 °C. Transcurridas 16 h el disco se lava con agua y se seca por centrifugación. Así, los seis antisuecos se imprimen a cuatro diluciones diferentes con seis réplicas cada una.

10 *Incubación en disco compacto*

Se toman 100 µL de la suspensión de bacterias, y se dispensan en una de las áreas del disco, dejándose incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, el disco se lava con agua y se seca por centrifugación.

15

*Detección y determinación mediante un lector/grabador de discos*

La detección se realiza escaneando el disco con un lector/grabador de discos. La aparición de puntos en la imagen obtenida en el ordenador identifica el tipo, factor y grupo de bacteria presente en la muestra.

20

*Amplificación de señal mediante tinción*

Alternativamente, las bacterias pueden teñirse previa o posteriormente a la incubación en el disco mediante técnicas de tinción descritas para ello (tinción Gram +), aumentando así la relación señal ruido.

25

*Determinación*

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Como se puede observar cada antisuero inmovilizado en el disco reconoce al tipo o grupo de bacteria única y específicamente con una relación señal ruido entre 51

30 (s11C) y 152 (s12). El control positivo se detecta para todas las cepas excepto s1.

**Tabla 1. Relación señal ruido obtenidas al analizar simultáneamente seis suspensiones de neumococos (*Streptococcus pneumoniae*) en disco**

Antisuero en disco	Muestra (cepa)					
	s1	s11C	s+	s12	s13	s20
s1	120	4	3	1	1	1
s11	1	51	1	1	2	3
s+	1	49	34	10	21	17
s12	1	3	1	145	7	7
s13	1	4	1	2	69	6
s20	1	2	6	3	1	150

35

**EJEMPLO 2: Identificación de *Salmonella spp.***

En el presente ejemplo o realización preferente dicho método comprende los siguientes pasos:

40

1. Resuspensión de bacterias
  2. Inmovilización de anticuerpos contenidos en antisuecos en formato de micromatriz mediante adsorción en disco
  3. Incubación en disco compacto
  4. Detección y determinación mediante un lector/grabador de discos
- 45
5. Amplificación de señal mediante tinción
  6. Determinación

*Resuspensión de bacterias*

50

Se parte de una suspensión de *Salmonella spp.* en tampón TBS-T.



En los apartados 2, 3, 4 y 5 se sigue el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 1 con la única diferencia que se utilizan antisueros específicos para esta bacteria.

*Determinación*

5

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3. Como se puede observar en todos los casos, se obtuvieron respuestas positivas para el bloque control (matriz de la izquierda). Por otro lado, se obtuvieron resultados positivos (matriz de la derecha) en el bloque con anticuerpos específicos para cada tipo de Salmonella (paneles I-III), siendo el resultado negativos para el control (panel IV).

10

**EJEMPLO 3: Identificación de *Escherichia coli***

En el presente ejemplo o realización preferente dicho método comprende los siguientes pasos:

15

1. Resuspensión de bacterias
2. Inmovilización de anticuerpos contenidos en antisueros en formato de micromatriz mediante adsorción en disco
3. Incubación en disco compacto
4. Detección y determinación mediante un lector/grabador de discos

20

5. Amplificación de señal mediante tinción
6. Determinación

*Resuspensión de bacterias*

25

Se parte de una suspensión de *E. coli* en tampón TBS-T.

*Inmovilización de anticuerpos contenidos en antisueros en formato de micromatriz mediante adsorción en disco*

30

En los apartados 2, 3, 4 y 5 se sigue el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 1, con la única diferencia que se utilizan antisueros específicos para esta bacteria.

*Determinación*

35

La selectividad del ensayo fue determinada utilizando diferentes serotipos de *E. coli*. La Figura 4 muestra las imágenes obtenidas tras la lectura del disco al analizar extractos de colonia pura. Como se puede observar en todos los casos, se obtuvieron respuestas positivas para el bloque control (matriz de la izquierda). Por otro lado, se obtuvieron resultados positivos (matriz de la derecha) en el bloque con anticuerpos específicos para cada serotipo de *E. coli* (paneles I-III), siendo el resultado negativos para el control (panel IV).

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar y/o detectar sin marcaje el tipo y/o grupo de al menos un virus y/o una bacteria previamente aislada e incubada en un medio sólido, caracterizado por comprender los siguientes 5 pasos esenciales:
- a) resuspender el virus y/o bacteria en una disolución acuosa tamponada seleccionada del grupo que consiste en PBST y TBS-T;
  - b) inmovilizar anticuerpos contenidos en un antisuero mediante adsorción en la cara de policarbonato de un disco compacto, formando una micromatriz en el disco; donde la 10 inmovilización comprende los siguientes pasos:
    - i) imprimir el disco con al menos una disolución del antisuero en presencia de un tampón de impresión que es una disolución acuosa de carbonato/bicarbonato 0,1 M a pH 9,5,
    - ii) 15 incubar a 4 °C durante un periodo de tiempo de al menos 16 horas,
    - iii) lavar con agua y secar el disco por centrifugación,
  - c) incubar la suspensión obtenida en el paso a) en el disco compacto obtenido en el paso b),
  - d) 20 detectar el virus y/o bacteria en el disco compacto mediante la lectura del disco con un lector/grabador de discos compactos utilizando el láser del propio grabador como haz interrogante y el fotodiodo propio del cabezal pickup como elemento detector; y
  - e) determinar la concentración de virus y/o bacteria en función de la disminución de señal de reflexión obtenida en la etapa d).
2. El método según la reivindicación 1 caracterizado por que antes o después del paso c) 25 comprende el siguiente paso adicional:
- f) teñir el virus y/o bacteria.
3. El método según las reivindicaciones 1-2, caracterizado por que la muestra se selecciona de 30 entre el siguiente grupo: sangre, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, orina, y secreción lacrimal.
4. El método según las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que la micromatriz del paso b) comprende entre 50 - 200 puntos que comprenden al menos un anticuerpo del virus y/o bacteria.
5. El método según la reivindicación 4, caracterizado por que los puntos tienen al menos entre 0,3- 35 0,5 mm de diámetro y están separados al menos 1,0 mm.
6. El método según las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que el haz de luz del láser es absorbido y dispersado por al menos un precipitado producido por la interacción específica del anticuerpo 40 con el virus y/o bacteria, disminuyendo la intensidad de la señal de reflexión que detecta el fotodiodo del cabezal pickup.
7. El método según la reivindicación 6, caracterizado por que la disminución de señal de reflexión se relaciona directamente con la interacción específica del anticuerpo con el virus y/o bacteria. 45
8. El método según las reivindicaciones 1-7, caracterizado por que la determinación del tipo y/o grupo del virus y/o bacteria definida en el paso e) se realiza visualmente con una plantilla que indica la localización del anticuerpo y de una tabla en la que se encuentran las diferentes combinaciones de 50 señales positivas del anticuerpo, indicándose también a qué tipo y/o grupo de bacteria y/o virus corresponden dichas señales.
9. Un método para inmovilizar al menos un anticuerpo de al menos un virus y/o una bacteria, caracterizado por emplear como soporte un disco compacto, dicho método comprende los siguientes 55 pasos:
- i) imprimir la cara de policarbonato del disco con al menos una disolución de antisuero en presencia de un tampón de impresión que es una disolución acuosa de carbonato/bicarbonato 0,1 M a pH 9,5,
  - ii) 60 incubar a 4 °C durante un periodo de tiempo de al menos 16 horas, y
  - iii) lavar con agua y secar el disco,
- donde se mantienen las propiedades ópticas y mecánicas del disco.
10. Un disco compacto caracterizado por comprender al menos un anticuerpo de al menos un virus y/o una bacteria, formando una micromatriz para ser leído por un lector/grabador de discos compactos.
11. Uso del disco definido en las reivindicaciones 10, para identificar y/o detectar sin marcaje el tipo y/o grupo de al menos un virus y/o una bacteria previamente aislada e incubada en un medio sólido. 65

## ES 2 425 714 A1

12. Uso según la reivindicación 11, caracterizado por que la identificación y/o detección sin marcaje del tipo y/o grupo de al menos un virus y/o una bacteria es para vigilancia epidemiológica.
13. Uso según la reivindicación 11, caracterizado por que la identificación y/o detección sin marcaje  
5 del tipo y/o grupo de al menos un virus y/o una bacteria es para control de calidad de agua y/o aire.

FIGURA. 1

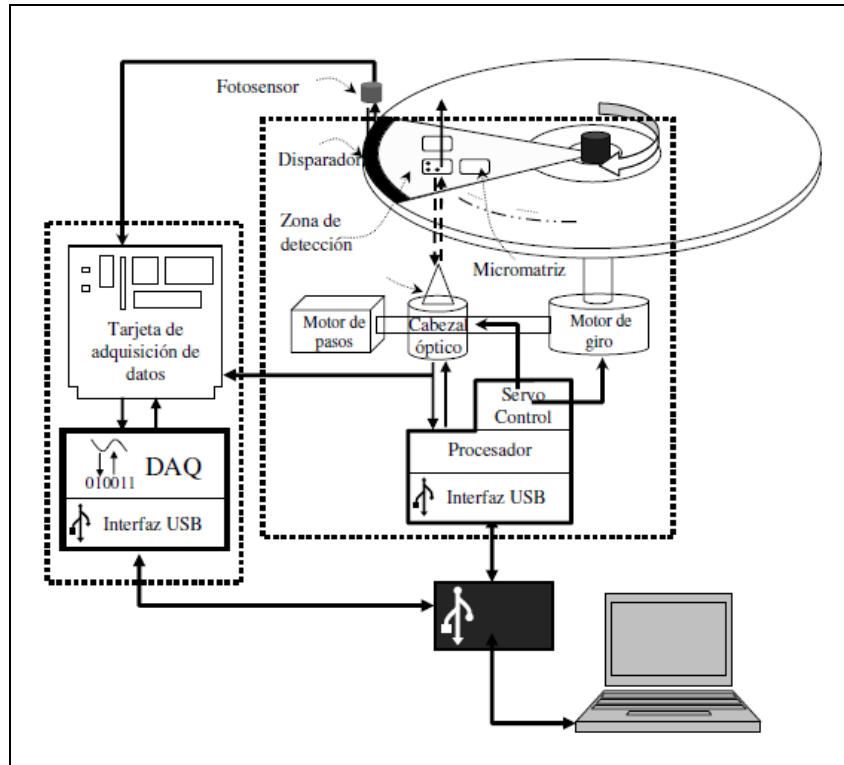


FIGURA. 2

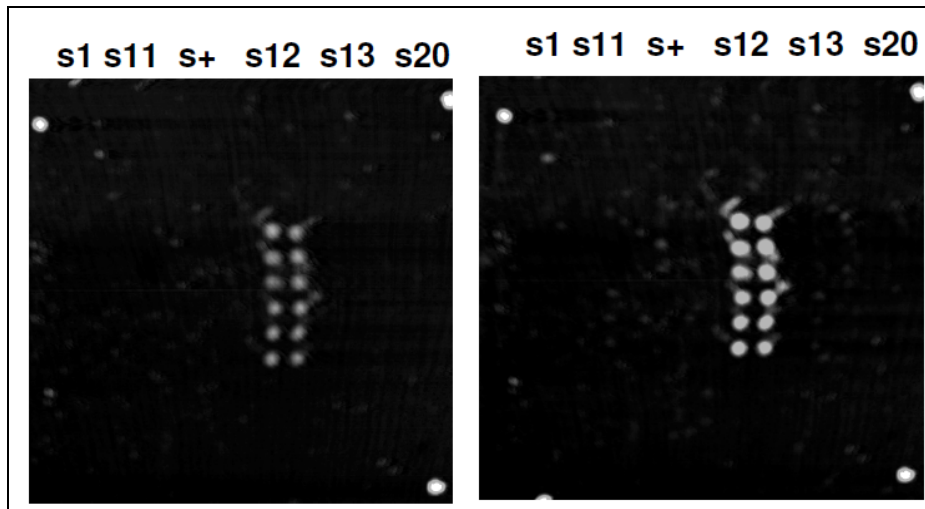


FIGURA. 3

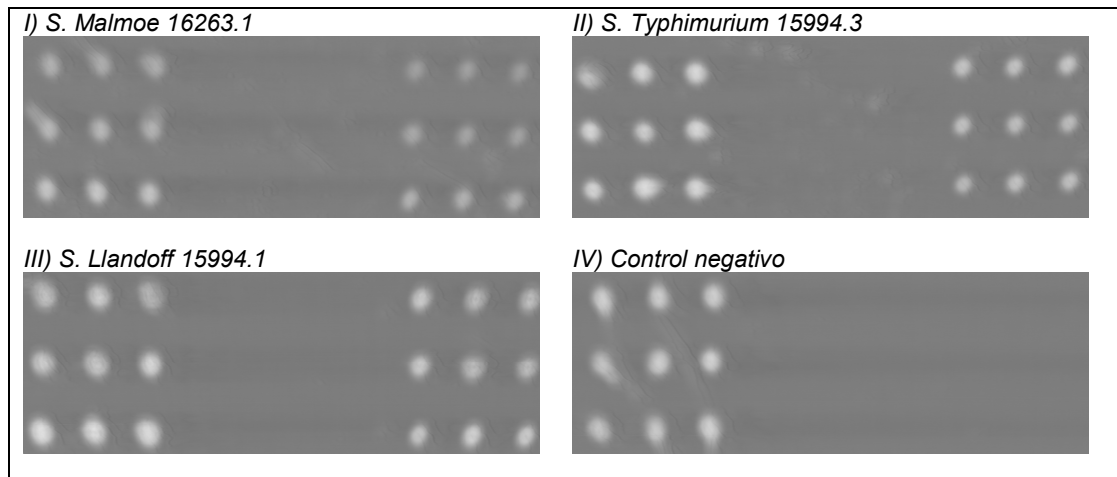


FIGURA. 4

