

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 597**

21 Número de solicitud: 201331885

51 Int. Cl.:

G01N 33/577 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.12.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.06.2015

71 Solicitantes:

**CERTEST BIOTEC, S.L. (100.0%)
Pol. Ind. Río Gállego II Calle J nº 1
50840 SAN MATEO DE GALLEGO (ZARAGOZA) ES**

72 Inventor/es:

**LANDETA ELORZ, Oscar;
VELASCO MICHELENA, Beatriz;
CAMACHO PEIRO, Ana Isabel y
GAMAZO DE LA RASILLA, Carlos**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Dispositivo para la detección de Shigella dysenteriae serotipo 1**

57 Resumen:

Dispositivo para la detección de Shigella dysenteriae serotipo 1.

La presente invención se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico para la detección simultánea y diferenciada de Shigella dysenteriae serotipo 1 y de la toxina Shiga. Asimismo, se refiere a un procedimiento para la detección de Shigella dysenteriae serotipo 1 mediante la utilización de dicho dispositivo inmunocromatográfico y a un kit que comprende dicho dispositivo inmunocromatográfico.

ES 2 538 597 A1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para la detección de *Shigella dysenteriae* serotipo 1

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la detección de *Shigella dysenteriae*. En concreto, se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico para la detección de *Shigella dysenteriae* serotipo 1 de una manera rápida, sencilla y fiable

10

Antecedentes de la invención

El género *Shigella* está constituido por bacilos Gram-negativos inmóviles, no capsulados que no fermentan la lactosa y son fermentadores de la glucosa con producción de ácido pero no de gas. Este género posee cuatro especies: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei* y cada especie, con la excepción de *S. sonnei*, tiene varios serotipos. En general, *S. sonnei* es más común en los países desarrollados y *S. flexneri* y *S. dysenteriae* serotipo 1, en países en desarrollo. El sello distintivo de la infección por *Shigella* es la diarrea con sangre, frecuentemente conocida como “disentería”.

20

Los únicos huéspedes naturales de *Shigella* son el humano y algunas especies de primates. Son altamente transmisibles con una dosis infecciosa muy baja, del orden de 10 a 100 microorganismos. La transmisión tiene lugar a través de alimentos contaminados con heces, por las manos, fómites o incluso por las moscas.

25

La disentería epidémica en países en desarrollo es causada frecuentemente por *S. dysenteriae* serotipo 1, también llamada Shiga bacillus. *Shigella dysenteriae* serotipo 1 (referida de aquí en adelante como *S. dysenteriae* 1 o SD1) difiere de otros serotipos de *S. dysenteriae* y de otras cepas de *Shigella* por varias razones:

30

- Solo *S. dysenteriae* 1 expresa la toxina Shiga Stx (STX).
- Solo *S. dysenteriae* 1 causa epidemias de disentería grandes y prolongadas.
- La infección con *S. dysenteriae* 1 causa enfermedad más grave, más prolongada y con mayor letalidad que las infecciones producidas por otros grupos de *Shigella*.
- La resistencia a los antimicrobianos se desarrolla más rápidamente y ocurre con

mayor frecuencia cuando se trata de cepas de *S. dysenteriae* 1 que con otros grupos.

La identificación tradicional de *Shigella spp* se basa en su aislamiento en medios de cultivo. Para un aislamiento óptimo de este microorganismo, deben utilizarse dos medios selectivos diferentes: uno de siembra para propósitos generales de baja selectividad, como el AMC (Agar MacConkey), y otro de agar más selectivo, como es el agar DXL (Agar desoxicolato xilosa lisina). Una vez seleccionadas las colonias sospechosas de las placas de AMC y agar DXL se inoculan en medios de pesquisaje apropiados, tales como agar hierro de Kligler (AHK) o agar hierro triple azúcar (AHTA).

10

Recientemente se han desarrollado distintos métodos de identificación molecular basados, por ejemplo, en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en enzimoimmunoensayos, en epifluorescencia, etc.. Sin embargo, estos métodos son caros, necesitan de personal especializado y equipamiento sofisticado. Además, por ejemplo en el caso de los métodos basados en PCR, la mayoría se basan en la amplificación de la secuencia del gen del antígeno H del plásmido de invasión (ipaH), expresado por las cuatro especies de *Shigella* (CN 102424839 A, resumen). Sin embargo, dicho gen también lo expresan otros organismos, como *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), lo que resulta en falsos positivos.

15

Existen también en el mercado kits para la identificación serológica de *Shigella* (*Shigella slide agglutination antisera*® de Pro-lab diagnostics, por ejemplo). La identificación serológica se lleva a cabo mediante el cultivo y la posterior mezcla de las colonias sospechosas de ser *Shigella* con un antisuero que contiene anticuerpos específicos contra *Shigella*. Las bacterias *Shigella* se aglutinan (aglomeran) en presencia de antisuero homólogo. Este método, sin embargo, debe ser realizado por personal cualificado.

25

No se ha descrito hasta el momento ningún ensayo inmunocromatográfico para la detección de *Shigella* que pueda ser llevado a cabo sin necesidad de equipación especial y de una manera rápida y sencilla. En este sentido, los autores de la presente invención, han desarrollado un dispositivo inmunocromatográfico para la detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 mediante la preparación de una única muestra y que puede llevarse a cabo sin necesidad de un cultivo previo. Sorprendentemente, dicho dispositivo permite identificar el serotipo 1 de *S. dysenteriae* y diferenciar *Shigella dysenteriae* serotipo 1 y *E.coli* evitando falsos positivos. La presente invención, proporciona así un método de detección de *S.*

30

dysenteriae serotipo 1, basado en la utilización de dicho dispositivo inmunocromatográfico, rápido, sencillo y de fácil interpretación.

Objeto de la invención

5

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para detectar *Shigella dysenteriae* serotipo 1 (dispositivo de la invención) caracterizado por que comprende:

i) dos tiras inmunocromatográficas,

10 donde una tira (8') comprende en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-*S. dysenteriae* 1 (2') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-*S. dysenteriae* 1 (4')

15 inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6), y

donde otra tira (8'') comprende en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-STX (2'') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

20 - una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-STX (4'') inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6),

o

ii) una tira inmunocromatográfica (8''') que comprende en el sentido del flujo:

25 - un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con una mezcla de micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-*S. dysenteriae* 1 y micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-STX (2''') depositada sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-*S. dysenteriae* 1 y un

30 segundo anticuerpo anti-STX inmovilizados por separado (4'''), y

- un segundo material absorbente (6).

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar *S. dysenteriae* 1 (procedimiento de la invención) caracterizado por que comprende las

siguientes etapas:

- a) tomar una muestra,
 - b) dispersar la muestra tomada en la etapa a) en un diluyente,
 - c) aplicar la dispersión obtenida en la etapa b) en la zona de aplicación de la muestra
- 5 (1) del dispositivo de la invención, y
- d) esperar a la aparición de inmunocomplejos en la membrana porosa (3).

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del dispositivo de la invención para la detección de *S. dysenteriae 1*.

10

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección de *S. dysenteriae 1* que comprende el dispositivo de la invención.

Breve descripción de las figuras

15

Figura 1: Vistas del dispositivo de la invención. **A:** Vista en perspectiva de una tira inmunocromatográfica (8), que comprende, en el sentido del flujo, los siguientes elementos: un lugar de aplicación de la muestra (1), un lugar en el que se han depositado micropartículas conjugadas con un anticuerpo específico para el marcador de interés a

20 detectar (2), una membrana porosa (3) con una línea de test para la detección del marcador de interés (4) y con una línea control (5), y un material absorbente (6), y está situada sobre un soporte plástico (7). **B:** Vista en planta superior del dispositivo para la detección de *S. dysenteriae 1* con dos tiras inmunocromatográficas (8', 8''). **C:** Vista en planta superior del dispositivo de la Fig. 1B introducido en una carcasa (11) que tiene una ventana de aplicación

25 de la muestra (9) y una ventana de resultados (10) para cada tira inmunocromatográfica.

Figura 2: **A:** Vista en perspectiva de una tira inmunocromatográfica (8'''), que comprende, en el sentido del flujo, los siguientes elementos: un lugar de aplicación de la muestra (1), un lugar en el que se ha depositado una mezcla de micropartículas conjugadas con un anticuerpo anti-*S. dysenteriae 1* y de micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-STX (2'''), una membrana porosa (3) con dos líneas de test (4'''), una para la detección de *S. dysenteriae 1* y otra para la detección de STX y con una línea control (5), y un material absorbente (6), y está situada sobre un soporte plástico (7). **B:** Vista en planta superior del dispositivo de la Fig. 2A. **C:** Vista en planta superior del dispositivo de la Fig. 2B introducido

30

en una carcasa (11) que tiene una ventana de aplicación de la muestra (9) y una ventana de resultados (10).

Figura 3: Representación gráfica de las etapas del procedimiento de detección de *S. dysenteriae 1* desde la toma de muestra hasta la aplicación de la muestra en el dispositivo inmunocromatográfico.

Descripción detallada de la invención

10 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para detectar *Shigella dysenteriae 1* caracterizado por que comprende una tira inmunocromatográfica (Figura 2) o dos tiras inmunocromatográficas (Figura 1) para la detección simultáneamente y diferencial de *S. dysenteriae 1* y de la toxina Shiga (STX) únicamente producida por el serotipo 1 de *S. dysenteriae*. Así, el primer aspecto de la
15 presente invención se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para detectar *Shigella dysenteriae 1* (dispositivo de la invención) caracterizado por que comprende:

i) dos tiras inmunocromatográficas,

donde una tira (8') comprende en el sentido del flujo:

20 - un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-*S. dysenteriae 1* (2') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-*S. dysenteriae 1* (4') inmovilizado, y

25 - un segundo material absorbente (6), y

donde otra tira (8'') comprende en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-STX (2'') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

30 - una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-STX (4'') inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6),

o

ii) una tira inmunocromatográfica (8''') que comprende en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la

muestra (1) y una zona con una mezcla de micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-*S. dysenteriae* 1 y micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-STX (2''') depositada sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-*S. dysenteriae* 1 y un segundo anticuerpo anti-STX inmovilizados por separado (4'''), y
- un segundo material absorbente (6).

Los anticuerpos anti-*Shigella dysenteriae* 1 (anti-SD1) son anticuerpos específicos del serotipo 1 de *S. dysenteriae*, que no reconocen otros serotipos de *Shigella*. Así, con los dispositivos descritos anteriormente se discrimina entre el serotipo 1 y los otros serotipos de *S. dysenteriae*. Además, dicha discriminación se ve confirmada por la detección de la toxina STX, ya que sólo el serotipo 1 de *S. dysenteriae* expresa la toxina Shiga Stx.

Los anticuerpos anti-SD1 y anti-STX pueden producirse mediante técnicas del ADN recombinante conocidas por el experto en la materia. En los ejemplos 1 y 2 de la presente solicitud se describen métodos de producción de anticuerpos anti-SD1 y anti-STX, respectivamente.

En los dispositivos descritos en los párrafos anteriores, el primer y segundo anticuerpo anti-SD1 y anti-STX pueden monoclonales o policlonales. En el caso de anticuerpos monoclonales pueden ser el mismo o diferentes. En el caso de varios anticuerpos monoclonales, estos deben ser cooperantes. En el caso de que el primer y segundo anticuerpo sea el mismo anticuerpo monoclonal, dicho anticuerpo monoclonal es autocooperante. En los términos de la presente invención los anticuerpos monoclonales cooperantes se refieren a aquellos anticuerpos monoclonales que pueden unirse simultáneamente al mismo antígeno, ya que reconocen epítomos diferentes (separados) de dicho antígeno. El anticuerpo autocooperante se refiere a aquel que reconoce un epítomo repetido en el antígeno.

La mejor detección de SD1 y STX se consigue con los anticuerpos SD1-09 (ejemplo 1) y STX-03 (ejemplo 2), así, en una realización particular del dispositivo de la invención, los anticuerpos utilizados son el anticuerpo monoclonal SD1-09 para la detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 y el anticuerpo monoclonal STX-03 para la detección de la toxina Shiga Stx.

Con los anticuerpos específicos anti-SD1 y anti-STX se preparan, por separado, conjugados con micropartículas mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Las micropartículas utilizables para la realización de inmunoensayos cromatográficos son conocidas por el experto en la materia. En una realización particular la micropartícula se
5 selecciona del grupo formado por micropartículas de poliestireno, micropartículas de carbono, oro coloidal, selenio coloidal. En una realización más particular, las micropartículas son de poliestireno.

Las micropartículas conjugadas con los distintos anticuerpos (anti-SD1 y anti-STX) actúan
10 como fase móvil (Fig. 1A, (2)). Los anticuerpos inmovilizados sobre la membrana porosa (3) actúan como fase fija (Fig. 1A, (4)), donde se produce la captura inmunológica por separado de SD1 y STX.

Para que la visualización del resultado obtenido con el dispositivo de la invención, es decir,
15 de los inmunocomplejos (complejos antígeno-anticuerpo) obtenidos tras la captura inmunológica sobre la membrana porosa (3), sea fácil y sencilla, las micropartículas de la presente invención están marcadas de manera que su visualización no requiera reactivos adicionales (no sea, por ejemplo, un inmunoensayo ligado a enzima). Así, en una realización particular, las micropartículas son micropartículas coloreadas, en particular micropartículas
20 de poliestireno coloreadas. En una realización particular, SD1 y STX se detectan en dos tiras inmunocromatográficas distintas y las micropartículas de poliestireno tienen el mismo color para SD1 y STX.

Los materiales absorbentes primero y segundo (1, 6) y la membrana porosa (3) utilizados en
25 la tira inmunocromatográfica de los dispositivos descritos en los párrafos anteriores son los generalmente utilizados en los ensayos inmunocromatográficos y son conocidos por el experto en la materia. En una realización particular, el primer material absorbente (*sample pad*) se selecciona del grupo formado por fibra de vidrio, celulosa y poliéster. En otra realización particular, la membrana porosa (3) es nitrocelulosa. En otra realización particular,
30 el segundo material absorbente (*absorbent pad*) es celulosa.

Para tener certeza de que el dispositivo de la invención ha funcionado correctamente es preferible incluir un control interno positivo de la formación de inmunocomplejos sobre la membrana porosa (3). Cualquier combinación antígeno-anticuerpo específica, conocida por

el experto en la materia, es adecuada como control interno positivo. Así, en una realización particular, se incluye un control positivo en cada tira inmunocromatográfica del dispositivo de la invención, para ello, junto con las micropartículas conjugadas con los distintos anticuerpos (anti-SD1 y anti-STX) se depositan micropartículas conjugadas con una proteína específica (proteína control) y en la membrana porosa (3) se inmovilizan los anticuerpos anti-proteína específica (5) por separado de los anticuerpos anti-SD1 y anti-STX. Al igual que las micropartículas conjugadas con anticuerpos específicos para los marcadores SD1 y STX, las micropartículas utilizables para formar las micropartículas conjugadas con la proteína control son conocidas por el experto en la materia, seleccionándose, en una realización particular, del grupo formado por micropartículas de poliestireno, micropartículas de carbono, oro coloidal, selenio coloidal. En una realización más particular, las micropartículas son de poliestireno. En una realización particular, las micropartículas son micropartículas marcadas, en particular, micropartículas coloreadas, que pueden ser de colores diferentes o del mismo color que las micropartículas específicas de SD1 y STX, ya que los anticuerpos específicos anti-SD1 y anti-STX se inmovilizan en la membrana porosa (3) separadamente de los anticuerpos anti-proteína control (5). En una realización particular, para facilitar la interpretación del resultado, las micropartículas de la línea control tienen un color distinto a las micropartículas de la línea de test.

En una realización particular, la proteína control es estreptavidina, así, las micropartículas tienen estreptavidina en la superficie y los anticuerpos inmovilizados son anticuerpos anti-estreptavidina.

En una realización particular, los anticuerpos anti-SD1 y anti-STX y los anticuerpos anti-proteína control que se inmovilizan en la membrana porosa (3) se inmovilizan en forma de línea (línea control (5), línea de test (4)). En una realización particular, cada conjunto de elementos 1-6 para la detección de SD1 y STX se dispone sobre un soporte plástico (7) en forma de tira.

Con el dispositivo inmucromatográfico de la presente invención se determina de manera simultánea y diferenciada la presencia de SD1 y STX, consiguiéndose así reducir el tiempo de ensayo y la variabilidad en el resultado debida a un mayor número de manipulaciones (en el dispositivo de la invención se utiliza una única muestra para todas las tiras inmunocromatográficas). Así, los autores de la presente invención han desarrollado un

dispositivo para la detección y/o el diagnóstico rápido, sencillo y eficaz de infección por *S. dysenteriae 1*. Además, dicho dispositivo funciona con muestras de heces, sin necesidad de un cultivo previo.

- 5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de *S. dysenteriae 1* (procedimiento de la invención) caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- a) tomar una muestra,
 - b) dispersar la muestra tomada en la etapa a) en un diluyente,
 - 10 c) aplicar la dispersión obtenida en la etapa b) en la zona de aplicación de la muestra (1) de un dispositivo inmunocromatográfico según el primer aspecto de la invención, y
 - d) esperar a la aparición de inmunocomplejos en la membrana porosa (3).

En una realización particular de la invención, en la etapa a) la muestra se selecciona del grupo formado por muestra biológica, agua y alimentos, de manera más particular se selecciona del grupo formado por heces, coprocultivos, agua y alimentos. En el contexto de la presente invención, el término coprocultivo se refiere al cultivo de materia fecal o heces. En el caso de utilizar como muestra agua o alimentos, es necesario hacer un cultivo a partir de la muestra. En una realización particular la muestra se selecciona del grupo formado por heces y coprocultivos. Los cultivos o coprocultivos se realizan por medios conocidos por el experto en la materia, en medios de enriquecimiento ya sean selectivos o no y líquidos o semisólidos (agar). En una realización preferida, la muestra son heces, no teniendo que realizar por tanto el cultivo de las mismas, lo que acelera y facilita el procedimiento de detección de *S. dysenteriae 1* de la presente invención, pudiéndose llevar a cabo sin necesidad de ningún equipamiento especial y hasta por el propio paciente.

En una realización particular de la invención, en la etapa a) se utiliza un vial de toma de muestra en el que se introduce la muestra con la ayuda de un vástago (etapa a), figura 3A y 3B) tras lo que se cierra el vial con el tapón a rosca y se agita vigorosamente (etapa b), figura 3C) para, posteriormente romper la parte superior del tapón (figura 3D) y añadir 4-5 gotas en la zona de aplicación de la muestra del dispositivo inmunocromatográfico (etapa c), figura 3E). De esta manera la manipulación de la muestra resulta un procedimiento sencillo, rápido e higiénico.

Para la realización del procedimiento de la invención, se toma y prepara una única muestra para la o las tiras inmunocromatográficas del dispositivo, lo que supone la importante ventaja de reducir la variabilidad en el resultado y el riesgo de errores asociados a un mayor número de manipulaciones de la muestra.

5

El diluyente utilizado en la etapa b) del procedimiento de la invención es cualquier diluyente válido para llevar a cabo un ensayo inmunocromatográfico, y es por tanto fácilmente determinable por el experto en la materia. El diluyente que mejor resultados proporciona es TRIS 250 mM, NaCl 100 mM, Taurodeoxicolato de Na 0,05 %, Albúmina bovina 0,05 %, Azida de Na 0,1% (% en peso/volumen), por lo que en una realización particular de la presente invención, el diluyente es TRIS 250 mM, NaCl 100 mM, Taurodeoxicolato de Na 0,05 %, Albúmina bovina 0,05 %, Azida de Na 0,1%. En una realización particular, en la etapa b) la muestra se resuspende en el diluyente de dispersión en una proporción aproximada 1/10, por ejemplo, 100 µL de muestra líquida o 100 mg de muestra sólida en 1 mL del diluyente. En el caso de utilizar una muestra de cultivo o coprocultivo, se resuspenden en 1 mL del diluyente de dispersión 3-5 colonias sospechosas de ser *S. dysenteriae* 1.

La etapa d) del método de la invención supone una espera de 5 a 10 minutos, preferiblemente de 10 minutos, para visualizar los distintos inmunocomplejos formados en la zona de membrana porosa (3) e interpretar el resultado.

Interpretación analítica de los resultados de la prueba.

El test se considera negativo si, asumiendo que los anticuerpos inmovilizados en la zona de membrana porosa se disponen en forma de línea, solo aparece la línea de control (5) en la ventana de resultados (10). Se considera positivo para SD1, si además de la línea de control aparece una línea (4') en la tira para SD1 (8'). Se considera positivo para STX si en la tira correspondiente (8'') además de la línea de control (5) aparece una línea (4'') para la toxina STX. En el caso de detección de SD1 y STX en una única tira inmunocromatográfica (8'''), se considera positivo para SD1 y STX, si además de la línea de control aparecen dos líneas (4''').

Interpretación diagnóstica de los resultados de la prueba.

Un resultado positivo para SD1 y negativo para STX indica que hay colonización de *S.*

dysenteriae 1. Un resultado positivo para SD1 y positivo para STX indica infección por *S. dysenteriae* serotipo 1. Por último, un resultado positivo para STX y negativo para SD1 indica que la infección está causada por alguna cepa enterohemorrágica de *E. coli* productora de VT1, y no por *S. dysenteriae* 1. Este resultado supone una importante ventaja ya que la detección simultánea de STX y SD1 evita los falsos positivos obtenibles con otros métodos de detección de *Shigella* (como por ejemplo el descrito en CN 102424839 A), lo que cuando se trata de infecciones de muestras biológicas tiene un gran interés diagnóstico ya que permite un diagnóstico más fiable de la bacteria causante de la infección y con ello la elección del tratamiento correcto. El anticuerpo anti-STX detecta la toxina Shiga de *S. dysenteriae* serotipo 1, y además, debido al alto grado de homología entre la secuencia de las toxinas VT1 de *E. coli* y Shiga de *S. dysenteriae* serotipo 1 (más de un 98%), dicho anticuerpo detecta también la toxina VT1 (también llamada toxina stx1) producida por *E. coli* enterohemorrágica.

5

10

15

20

25

Como se ha mencionado anteriormente el tiempo de desarrollo de la prueba es de 5 a 10 minutos, preferiblemente de 10 minutos, además el tiempo de preparación de la muestra en el caso de que la muestra sean heces es de unos 2 minutos, por ello, el tiempo requerido para llevar a cabo el método de la invención es mucho menor que los ensayos conocidos por el experto en la materia, donde en la mayoría se requieren cultivos previos de la muestra sospechosa de tener *S. dysenteriae* 1, y que son además mucho más complejos de llevar a cabo y necesitan de instrumentación de laboratorio y personal especializado. El método de la presente invención, se lleva a cabo con un dispositivo de un solo uso y sin necesidad de ningún tipo de instrumentación, por lo que por su sencillez, puede llevarse a cabo en la consulta del médico, e incluso, con las instrucciones adecuadas, por el propio paciente, quien puede además interpretar fácilmente el resultado.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los dispositivos de la invención descritos en el primer aspecto de la invención para la detección de *S. dysenteriae* 1. En una realización particular, se refiere al uso de cualquiera de los dispositivos de la invención descritos en el primer aspecto de la invención para el diagnóstico de infección por *S. dysenteriae* 1.

30

Para una mayor facilidad y conveniencia, el dispositivo de diagnóstico puede introducirse en una carcasa (11) y agruparse con un vial para la toma de la muestra, y opcionalmente el

diluyente para la dispersión de la muestra, junto las instrucciones de uso, en forma de kit. Así, en un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección de *S. dysenteriae* 1 (kit de la invención) que comprende un dispositivo inmunocromatográfico según el primer aspecto de la presente invención. En otra realización particular, el kit de la invención comprende además un vial para la toma de muestras, conteniendo el vial, en otra realización particular, el diluyente para la dispersión de la muestra. En otra realización particular, el kit comprende el dispositivo de la invención introducido en una carcasa de plástico (11, figura 1C). Dicha carcasa de plástico, donde se introduce el dispositivo de la invención con 1 ó 2 tiras inmunocromatográficas, tiene dos ventanas por cada tira inmunocromatográfica, una para la aplicación de la muestra (9) y otra para la visualización de los resultados (10) donde C y T indican la posición de la línea control (5) y la línea de test (4), respectivamente (Fig. 1C).

Ejemplos

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

EJEMPLO 1. Preparación de una tira inmunocromatográfica para la detección de *Shigella dysenteriae* serotipo 1 (SD1).

1.1. Preparación y purificación de anticuerpos monoclonales anti-SD1

El anticuerpo monoclonal autocooperante anti-*S. dysenteriae* serotipo 1 SD1-09 se purifico a partir de cultivo del hibridoma del mismo nombre. La obtención del hibridoma productor de dicho anticuerpo se realizó mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia, como es el método de fusión celular y selección de los clones. En particular, la obtención del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal anti-SD1 se realizó mediante inmunización de ratones del tipo BALB/c con extracto de cultivo de *Shigella dysenteriae* Serotipo 1.

El extracto de cultivo de SD1 se obtuvo por métodos conocidos por el experto en la materia a partir de una cepa *Shigella dysenteriae* del serotipo 1 (CECT 584) que se mantuvo congelada en criobolas (- 80 °C) hasta su empleo. Con objeto de recuperar su viabilidad, se realizó un primer cultivo en el medio en TSA (Agar de Tripticasa y Soja), recuperando las colonias tras incubación durante 24 h a 37 °C en atmósfera aeróbica. Empleando estas colonias se inocularon matraces de 2 L de capacidad conteniendo 500 mL de medio de

cultivo líquido TSB (*Tryptic Soy Broth*), que fueron incubados durante 24 h a 37 °C en atmósfera aeróbica.

5 Los linfocitos de los ratones inmunizados se fusionaron con células mielómicas de la línea SP20 y los hibridomas obtenidos se seleccionaron mediante técnicas ELISA de la siguiente manera: los pocillos de una placa microtiter de 96 pocillos se tapizaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-SD1 en tampón carbonato 100 mM de pH 9 a 37 °C durante 1 h. A estos pocillos se añadió el extracto de cultivo de SD1 en PBS a 37°C durante 1 hora. Tras su lavado se añadieron las distintas muestras de cultivo de hibridomas y la presencia del anticuerpo anti-SD1 se reveló utilizando un conjugado anti-mIgG con peroxidasa y el sustrato correspondiente. Se seleccionaron los hibridomas que mayor afinidad y mejor especificidad presentaron. Entre estos se seleccionaron los más productores y los que mejores prestaciones ofrecieron en los pruebas de estrés térmico y velocidad de reacción frente al antígeno.

15 El hibridoma seleccionado (SD1-09) se cultivó en medio RPMI-HT durante varios días a 37 °C centígrados con 5% de CO₂. A partir del medio de cultivo se purificó el anticuerpo por cromatografía de afinidad a proteína A según las instrucciones del fabricante de la columna (GE Healthcare) tras lo que se dializaron en PBS de pH 7,4.

20 1.2. Preparación de las micropartículas conjugadas con anticuerpos anti-SD1

Se preparó un conjugado del anticuerpo SD1-09 con micropartículas de poliestireno. Se utilizan partículas coloreadas con grupos carboxilo en su superficie de 300 nm de diámetro nominal (K1 030 de la marca Estapor, Merck, Darmstadt, Alemania). 1 mL de partículas al 10% se lavaron por centrifugación y resuspensión en tampón MES (ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico) 10 mM de pH 6 y se le añade EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) hasta una concentración de 5 mM. Se incuba 1h a 37 °C y se retira el exceso de reactivo por centrifugación. Dichas micropartículas se resuspendieron en MES 10 mM de pH 6 y se les añadió el anticuerpo monoclonal anti-SD1 hasta una concentración superficial de 2 mg/m² tras lo que se incubaron 18 h a 4 °C y posteriormente se lavaron en Tween 20 al 0,1%.

Los conjugados con micropartículas para la línea de control se obtienen de la misma manera pero, utilizando en lugar del anticuerpo, estreptavidina (S4762, Sigma-Aldrich) a una

concentración superficial final de 1 mg/m².

1.3. Preparación de la tira de detección de SD1

Una mezcla de las micropartículas conjugadas con anticuerpos anti-SD1 y de
 5 micropartículas conjugadas con estreptavidina descritas en el apartado anterior, en
 concentraciones de 0,06% y 0,04% respectivamente, se diluyeron en una solución que
 contiene sacarosa 10%, caseína bovina 2%, albúmina bovina 2%, PEG-6000 1% y Tween-
 20 2% en tampón TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) de pH 9,0. Esta solución se depositó
 10 a razón de 12 µL/cm en un material bobinado de fibras de poliéster no entretejidas de 29
 mm de ancho que se secó en corriente de aire a 45 °C tras la deposición (5 minutos) y
 durante 24 h en una cámara a 30 °C y 15 % de humedad relativa.

Los anticuerpos anti-SD1 (para la línea de test) y anti-estreptavidina (para la línea control)
 se dializaron en PBS, se llevaron a una concentración de 1 mg/mL y se depositaron
 15 linealmente por separado y de forma paralela sobre una membrana de nitrocelulosa
 laminada (3) (Hi-Flow Plus de Millipore o similar) de 25 mm de ancho y de tamaño de poro
 entre 10 y 30 µm a razón de 1 µL/cm tras lo cual se secaron en corriente de aire a 45 °C tras
 la deposición (2 minutos) e inmediatamente después durante 24 h en una cámara a 30 °C y
 15 % de humedad relativa.

20 El material con las micropartículas, la membrana y el material absorbente se montó
 conforme indica la figura 1A sobre un soporte plástico (7) con una lámina adhesiva y las tiras
 se cortaron transversalmente a su montaje a una anchura de 4 mm.

EJEMPLO 2.- Preparación de una tira inmunocromatográfica para la detección de la Toxina Shiga Stx

2.1.- Clonación del gen *stx* de *Shigella dysenteriae* Serotipo 1

El gen *stx* (Shiga Toxina, Número de Acceso de *GenBank* AJ271153.1 para StxA y
 AJ271153 para StxB) de *Shigella dysenteriae* Type 1 se clonó en los sitios NcoI/XhoI del
 30 plásmido pET-30b(+) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) empleando como molde para la
 amplificación mediante PCR de dicho gen, ADN genómico de la cepa toxigénica estándar
Shigella dysenteriae Tipo 1 NCTC 4837 strain Newcastle (Número ATCC, 13313).

La extracción de ADN genómico de la cepa *NCTC 4837* se llevó a cabo mediante el kit QIAamp DNA Minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 El gen *stx* (1.226 pb) se amplificó usando la ADN Polimerasa TaKaRa LA Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) y los cebadores *stx1* de secuencia SEQ ID NO 1 (AGGACCATGGCTAAAATAATTATTTTTAGAGTGCTAA) y *stx2* de secuencia SEQ ID NO 2 (CAGCCTCGAGTTATCAACGAAAAATAACTTCGCTGAA). A la mezcla de PCR se añadieron deoxinucleótido trifosfato (2,5 mM de cada uno), cebadores (0,2 µM de cada uno), 5 µl de 10x LA PCR Buffer (Mg²⁺), 2 unidades de ADN polimerasa TaKaRa LA Taq, 50 ng de DNA genómico y agua purificada hasta un volumen final de 50 µL. La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante una desnaturalización inicial de 1 minuto a 94°C, 30 ciclos de desnaturalización (10 segundos a 98°C), anillamiento (30 segundos a 58°C) y extensión (30 segundos a 72°C) y un último ciclo de extensión de 10 minutos a 72°C.

15 El producto de PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El fragmento de ADN resultante se aisló y purificó mediante columnas Ultra Clean PCR Clean-Up (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EEUU) y se clonó en el plásmido pET-30b(+). Con el plásmido resultante se transformaron células competentes DH5α de *Escherichia coli* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EEUU). Los clones positivos se seleccionaron en placas de LB + 50µg/mL Kanamicina.

25 La expresión y purificación de la Shiga Toxina en *E. coli*, se llevó a cabo siguiendo los protocolos descritos en la solicitud de patente española ES 2385625 A1 para la glutamato deshidrogenasa (ver ejemplo 1, sección "Obtención de GDH de *Clostridium difficile*: Expresión y purificación de la proteína GDH en *E. coli*").

2.2.- Preparación y purificación de anticuerpos monoclonales anti-STX

30 El anticuerpo monoclonal autocooperante anti-STX se purificó a partir del cultivo del hibridoma del mismo nombre. El protocolo seguido es el mismo que el descrito en el ejemplo anterior para SD1, con la diferencia de que la obtención del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal anti-STX se realizó mediante inmunización de ratones del tipo BALB/c con STX de *Shigella dysenteriae* Serotipo 1 clonada, expresada y purificada tal y

como se describe en punto 2.1 anterior. En este caso el hibridoma seleccionado fue el STX-03, denominándose el anticuerpo producido STX-03.

2.3.- Preparación de las micropartículas conjugadas con anticuerpos anti-STX

- 5 Se preparó un conjugado del anticuerpo STX-03 con micropartículas de poliestireno tal y como se describe en el punto 1.3 anterior para SD1.

2.4.- Preparación de las tiras de detección de STX

- 10 El protocolo seguido es el mismo que el descrito en el ejemplo anterior para SD1 (punto 1.3), con la diferencia de que en la solución con la mezcla de micropartículas la concentración de las micropartículas conjugadas con anticuerpos anti-STX obtenidas en el punto 2.3 anterior y con estreptavidina descritas en el punto 1.2, es de 0,05% y 0,05% respectivamente.

15 EJEMPLO 3.- Montaje y utilización del dispositivo para detectar SD1 y STX.

Se disponen las dos tiras IC descritas en los ejemplos anteriores en el interior de una carcasa de material plástico (11) que se ha diseñado de tal forma que presenta un alojamiento para cada una de las tiras. La carcasa tiene, para cada tira, una ventana para la adición de la muestra (9) y otra ventana para la visualización de los resultados (10).

- 20 Se prepara una solución para la dispersión de las muestras de heces consistente en una disolución acuosa de NaCl 100 mM, TRIS 250 mM, Taurodeoxicolato de Na 0,05 %, Albúmina bovina 0,05 %, Azida de Na 0,1% (% en peso/volumen). Esta preparación se dispensa en viales para la toma de muestra a razón de 1 mL/vial.

- 25 Con dicho vial, se toma una muestra de heces y se resuspende aproximadamente 1/10 en el diluyente del párrafo anterior. Se agita vigorosamente y se aplican 4-5 gotas en la zona de aplicación de la muestra del dispositivo inmunocromatográfico (etapa c), figura 3E).

30 EJEMPLO 4.- Detección de SD1 y STX

Se prepararon diluciones seriadas 1/10 del extracto del cultivo de SD1 (obtenido en punto 1.1) y 1/2 de STX (proteína recombinante purificada obtenida en punto 2.1), en el diluyente de dispersión de muestras descrito en el apartado anterior. 100 µL de estas diluciones se aplican a los dispositivos inmunocromatográficos de la invención y se deja progresar el

ensayo durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C) tras lo cual se procede a interpretar el resultado mediante apreciación visual de aparición de la línea de test. Se realiza además la misma operación pero diluyendo la STX y el extracto de cultivo SD1 en un *pool* de muestras de heces resuspendidas aproximadamente 1/10 en el mismo tampón. Los resultados para STX se muestran en la tabla 1 y para SD1 en la tabla 2.

Tabla 1.- Detección de STX

ng STX/mL	En diluyente	En heces
80	+	+
40	+	+
20	+	+
10	+	+
5	+	+
2,5	-	-
1,25	-	-
0,625	-	-
0,3125	-	-
0,15	-	-
0	-	-

Tabla 2.- Detección de SD1

ng SD1/mL	En diluyente	En heces
$2,4 \times 10^8$	+	+
$2,4 \times 10^7$	+	+
$2,4 \times 10^6$	+	+
$2,4 \times 10^5$	+/-	+/-
$2,4 \times 10^4$	-	-
$2,4 \times 10^3$	-	-
$2,4 \times 10^2$	-	-
$2,4 \times 10^1$	-	-
0	-	-

El símbolo +/- se refiere a que usuarios no experimentados podrían no apreciarlo.

Una muestra de heces que contenga una concentración de STX igual o superior a 5 ng/mL y una concentración de SD1 mayor o igual a $2,4 \times 10^5$ ufc/ml heces, da resultados positivos usando el test de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1.- Dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para detectar *Shigella dysenteriae* serotipo 1 caracterizado por que comprende:

5 i) dos tiras inmunocromatográficas,

donde una tira (8') comprende en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-*S. dysenteriae* serotipo 1 (2') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

10 - una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-*S. dysenteriae* serotipo 1 (4') inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6), y

donde otra tira (8'') comprende en el sentido del flujo:

15 - un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-STX (2'') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-STX (4'') inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6),

o

20 ii) una tira inmunocromatográfica (8''') que comprende en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con una mezcla de micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-*S. dysenteriae* serotipo 1 y micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-STX (2''') depositada sobre dicho primer material absorbente,

25 - una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-*S. dysenteriae* serotipo 1 y un segundo anticuerpo anti-STX inmovilizados por separado (4'''), y

- un segundo material absorbente (6).

30 2.- Procedimiento para la detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

a) tomar una muestra,

b) dispersar la muestra tomada en la etapa a) en un diluyente,

c) aplicar la dispersión obtenida en la etapa b) en la zona de aplicación de la muestra (1) de un dispositivo inmunocromatográfico según la reivindicación 1,

d) esperar a la aparición de inmunocomplejos en la membrana porosa (3).

3.- Procedimiento según la reivindicación anterior, donde la muestra se selecciona del grupo formado por alimentos, agua y muestra biológica.

5

4.- Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, donde la muestra biológica se selecciona del grupo formado por heces y coprocultivos.

5.- Procedimiento según la reivindicación 2, donde la muestra es heces.

10

6.- Uso de un dispositivo según la reivindicación 1 para la detección de *S. dysenteriae* serotipo 1.

7.- Kit para la detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 que comprende un dispositivo según la reivindicación 1.

15

8.- Kit según la reivindicación anterior, donde el dispositivo está introducido en una carcasa con dos ventanas para cada tira inmunocromatográfica, siendo una ventana para la aplicación de la muestra (9) y otra ventana para la visualización de los resultados (10).

20

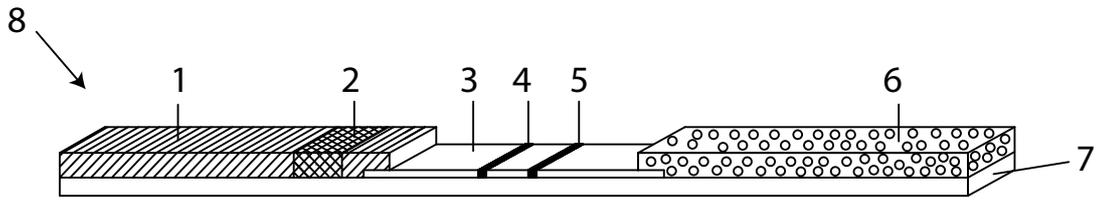


Fig. 1A

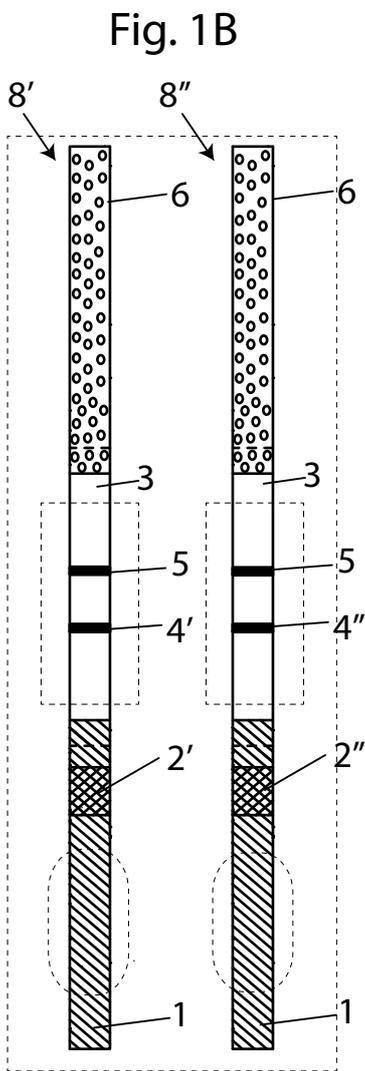


Fig. 1B

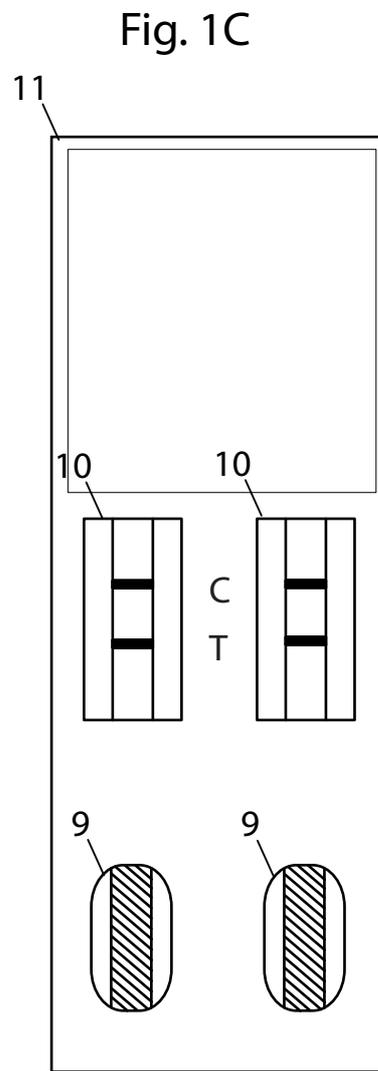


Fig. 1C

Fig. 1

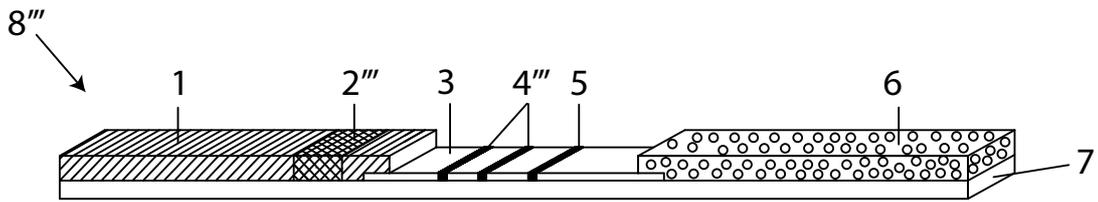


Fig. 2A

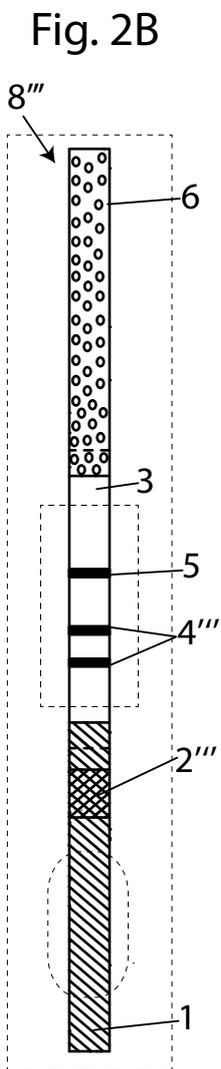


Fig. 2B

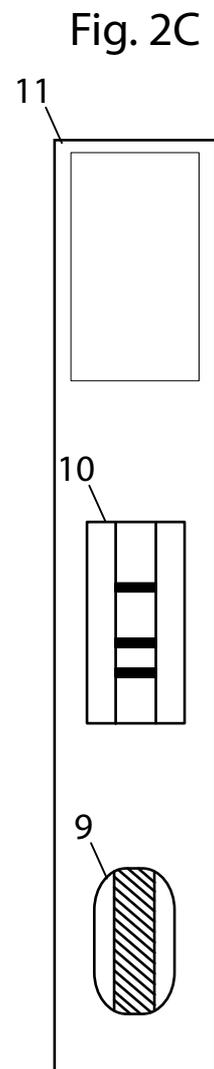


Fig. 2C

Fig. 2

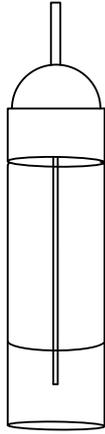


Fig. 3A

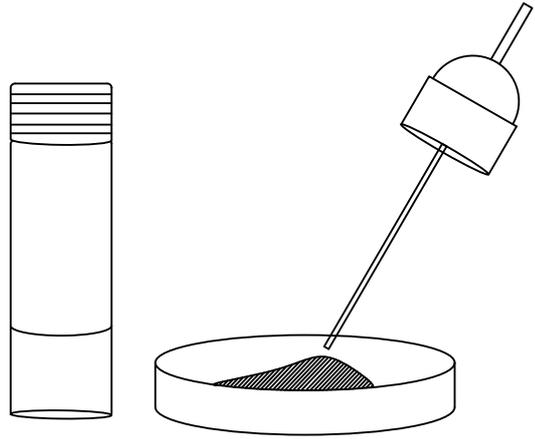


Fig. 3B

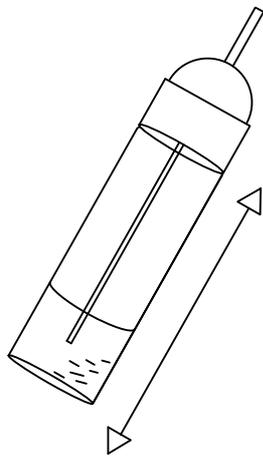


Fig. 3C

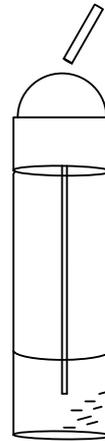


Fig. 3D

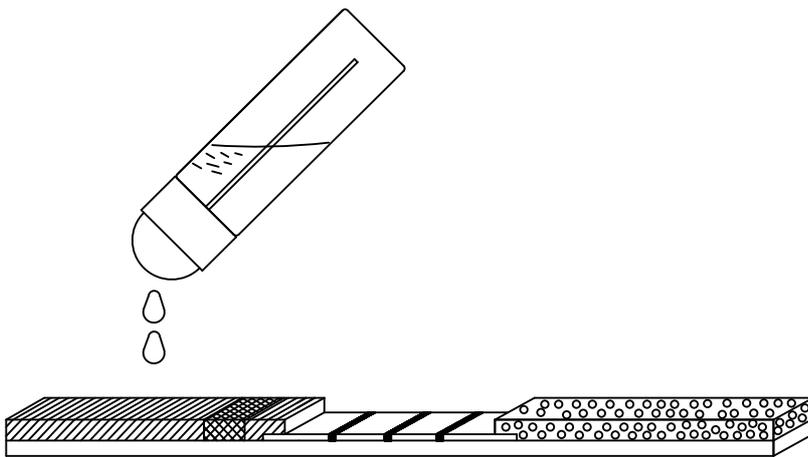


Fig. 3E

Fig.3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Certest Biotec S.L.
 <120> Dispositivo para la detección de Shigella dysenteriae serotipo 1
 <130> 109/13
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligo stx1
 <400> 1
 aggacatgg ctaaataat tatttttaga gtgctaa 37
 <210> 2
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligo stx2
 <400> 2
 cagcctcga ttatcaacga aaaataactt cgctgaa 37



- ②① N.º solicitud: 201331885
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.12.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/577** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	TANEJA, N et al. Dipstick Test for Rapid Diagnosis of <i>Shigella dysenteriae</i> 1 in Bacterial Cultures and Its Potential Use on Stool Samples. PLoS ONE. 2011, Vol. 6 (10), páginas 1-9 [on line]. <Doi: 10.1371/journal.pone.0024830>, especialmente páginas 2-3, 5-7.	1-8
Y	BURGOS, Y and BEUTIN, L. Evaluation of an Immuno-Chromatographic Detection System for Shiga Toxins and the <i>E.coli</i> O157 Antigen. Trends in Immunolabelled and Related techniques, Dr. Eltayb abuelzein (Ed.), 2012, páginas 29-40. ISBN: 978-953-51-0570-1 [on line]. [Recuperado el 3/12/2014]. Recuperado de Internet: <URL: http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/36200.pdf >, especialmente páginas 33-36.	1-8
A	WO 03065002 A2 (US GOV NAVY MED RES CENTER) 07/08/2003, especialmente página 9, líneas 24-27; página 12, líneas 8-10; figuras 1 y 2.	8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.12.2014

Examinador
J. Collado Martínez

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.12.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-8	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TANEJA, N et al. PLoS ONE. 2011, Vol. 6 (10), páginas 1-9	2011
D02	BURGOS, Y and BEUTIN, L. Trends in Immunolabelled and Related techniques, Dr. Eltayb abuelzein (Ed.), 2012, PÁGINAS 29-40.	2012

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para la detección simultánea en una muestra de la presencia de *Shigella dysenteriae* serotipo 1 y de la toxina Shiga (STX). La solicitud se refiere también a un kit que comprende el mencionado dispositivo, al uso del dispositivo para la detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 y a un procedimiento de detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 en una muestra empleando el dispositivo de la invención.

El documento D01 divulga un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para el diagnóstico de *S. dysenteriae* serotipo 1 (ver páginas 2-3, 5-7).

El documento D02 se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para la detección simultánea de toxinas Shiga y de un antígeno específico de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (ver páginas 33-36).

El documento D03 tiene por objeto un dispositivo para la detección mediante un ensayo de flujo lateral de *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende una tira inmunocromatográfica incluida en una carcasa de plástico que dispone de una ventana de aplicación de la muestra y de una ventana de detección (ver página 9, líneas 24-27; página 12, líneas 8-10; figuras 1 y 2).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1, LP 11/1986).

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación independiente 1 es D01. Dicho documento divulga un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para detectar *S. dysenteriae* serotipo 1 por medio de una tira inmunocromatográfica que comprende, en el sentido del flujo:

- Un primer material absorbente (poliéster) que comprende una zona de aplicación de la muestra, así como micropartículas de oro coloidal conjugadas con un primer anticuerpo anti-*S. dysenteriae* serotipo 1 (F24-70) y depositadas sobre dicho material absorbente (D01; página 2).
- Una membrana porosa de nitrocelulosa con un segundo anticuerpo anti-*S. dysenteriae* serotipo 1 (B15-14) situado en una línea sobre la membrana de nitro celulosa (D01; páginas 2-3), y
- Un segundo material absorbente de papel de filtro de celulosa (D01; página 3).

De lo expuesto se desprende que D01 no divulga todas las características definidas en la reivindicación 1, ya que el dispositivo de D01 no comprende una segunda tira inmunocromatográfica para la detección de STX o una sola tira inmunocromatográfica que incorpore a la vez anticuerpos anti-*S. dysenteriae* serotipo 1 y anti-STX. Por lo tanto, el objeto de la reivindicación 1 cumple el requisito de novedad establecido en el art. 6.1, LP 11/1986. Además, siendo nuevo el dispositivo, también han de considerarse nuevos el procedimiento de detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 que emplea el dispositivo de la invención, el uso del dispositivo para la detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 y el kit para la detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 que comprende el dispositivo. En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 2-8 satisface también el requisito de novedad del art. 6.1, LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1, LP 11/1986).

Como ya se ha indicado, la diferencia entre D01 y el objeto de la reivindicación 1 de la presente solicitud estriba en que el dispositivo de D01 no permite la detección simultánea en la misma muestra de *S. dysenteriae* serotipo 1 y de la toxina STX, empleando una o dos tiras inmunocromatográficas.

De acuerdo con la descripción aportada, el efecto técnico que se deriva de la detección en una misma muestra de un antígeno específico de *S. dysenteriae* serotipo 1 y de STX consiste en que dicha determinación simultánea confiere especificidad al test, pudiendo además interpretarse a partir de los resultados si un individuo presenta colonización o infección por *S. dysenteriae* serotipo 1 o si el agente infeccioso es *E. coli* (página 3, líneas 27-34; página 9, líneas 30-34 y página 11, línea 34-página 12, líneas 1-4). Así pues, se podría considerar que el problema técnico que viene a resolver el objeto de la solicitud consiste en la falta de un dispositivo para la detección sencilla, rápida y específica de *S. dysenteriae* serotipo 1 que permita además establecer, en su caso, si el individuo presenta colonización o infección por *S. dysenteriae* serotipo 1 o si la infección es por *E. coli*.

En relación con lo inmediatamente expuesto, el documento D01 divulga un dispositivo de flujo lateral que permite la detección, de una forma sencilla, rápida y específica, de *S. dysenteriae* serotipo 1 en muestras de heces (D01; resumen; páginas 5-7). Por otra parte, el documento D02 presenta un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral, análogo al de la invención, útil para la detección de la toxina STX de *S. dysenteriae* (D02; página 35,) y que permite además la detección simultánea en muestras de alimento del antígeno O157 de *E. coli*, empleando para ello una única tira inmunocromatográfica de flujo lateral (D02; páginas 33-34, 36). Por lo tanto, dado que la inclusión en un solo ensayo de flujo lateral de anticuerpos para detectar simultáneamente un antígeno específico y la toxina STX de una bacteria enteropatógena ya se encuentra en el estado de la técnica, y que los anticuerpos específicos contra *S. dysenteriae* serotipo 1 y contra la toxina STX de *S. dysenteriae* 1 también son conocidos por el experto en la materia, se considera que para este último resultaría obvio, a partir de las enseñanzas de D01 y D02, llegar a un dispositivo que permitiera la detección simultánea de *S. dysenteriae* serotipo 1 y STX en una sola muestra, empleando para ello una o dos tiras inmunocromatográficas en las que se incluyeran los anticuerpos anti-*S. dysenteriae* serotipo 1 y anti-STX.

En consecuencia, el dispositivo y kit objetos respectivamente de las reivindicaciones independientes 1 y 7, así como el procedimiento de detección de *S. dysenteriae* serotipo 1, objeto de la reivindicación independiente 2, y el uso del dispositivo para la detección de *S. dysenteriae* serotipo 1, objeto de la reivindicación independiente 6, no cumplirían el requisito de actividad inventiva en los términos del artículo 8.1 de la LP 11/1986.

Por otra parte, la implementación del procedimiento de detección de *S. dysenteriae* serotipo 1 empleando como muestras agua, alimentos o muestra biológicas, como por ejemplo heces o coprocultivos, y la inclusión de la tira inmunocromatográfica en una carcasa de plástico dotada de una ventana de aplicación de la muestra y otra de visualización de los resultados, forman parte del estado de la técnica y, por ello, se consideran características que no conferirían actividad inventiva a las reivindicaciones dependientes 3, 4, 5 y 8, de acuerdo con lo establecido en el art. 8.1 de la LP 11/1986.