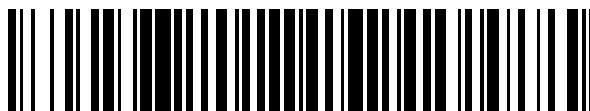


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 153**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2006** **E 06834659 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015** **EP 1970706**

54 Título: **Detección inmunocromatográfica de Staphylococcus multirresistente y kit de diagnóstico**

30 Prioridad:

14.12.2005 JP 2005360984

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

04.12.2015

73 Titular/es:

DENKA SEIKEN CO., LTD. (100.0%)
1-1, Nihonbashi Muromachi 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8338, JP

72 Inventor/es:

ITO, HIROMI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 553 153 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección inmunocromatográfica de *Staphylococcus* multirresistente y kit de diagnóstico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la detección inmunocromatográfica y a un kit que utiliza la misma.

10 **Antecedentes de la técnica**

Los estafilococos incluyen 40 o más tipos bacterianos clasificados ampliamente como *Staphylococcus aureus* y estafilococos negativos de coagulasa (abreviados de aquí en adelante a "ENC") desde el punto de vista clínico. Los *Staphylococcus aureus* se consideran organismos patógenos y los ENC se consideran organismos no patógenos.

15 Las infecciones se tratan con el uso de antibióticos. Puesto que muchos estafilococos son resistentes, se clasifican basándose en la resistencia desde el punto de vista clínico.

Entre los *Staphylococcus aureus* que son organismos patógenos clínicamente importantes, los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) son *Staphylococcus aureus* que muestran resistencia a agentes β -lactámicos, incluyendo penicilinas tales como meticilina. También, muchas bacterias muestran resistencia a muchos fármacos tales como aminoglicósidos y macrólidos. Por tanto, dichas bacterias se consideran clínicamente como *Staphylococcus aureus* multirresistentes. En contraposición, se hace referencia a los *Staphylococcus aureus* que muestran sensibilidad a meticilina como *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (a los que se hace referencia de aquí en adelante como "SASM").

25 Los *Staphylococcus aureus* producen una variedad de toxinas, incluyendo enterotoxina, toxina del síndrome de choque tóxico, hemolisina y toxina exfoliativa (Hideo IGARASHI: TSST-1, "*Shinshu to meneki* (Invasion and immunity)", 3, 3-10, 1994). La infección con dichas toxinas causaría enteritis, neumonía, dermatitis, insuficiencia orgánica o similar, y la infección grave puede conducir a la muerte. Cuando se aíslan *Staphylococcus aureus* de un paciente, por consiguiente, sean o no la bacteria SARM, deben inspeccionarse tan rápido como sea posible. En el caso de infecciones por SARM, deben seleccionarse y administrarse al paciente fármacos adecuados tales como vancomicina o sulfato de arbekacina, que se considera que son eficaces contra SARM.

35 Los estafilococos distintos de *Staphylococcus aureus* son bacterias endógenas y son no patógenos para individuos sanos en general. Sin embargo, cuando un paciente de trasplante de órgano toma un inmunosupresor como medida para prevenir una infección postoperatoria, o en el caso del denominado paciente inmunocomprometido con un sistema inmunitario debilitado debido a una fuerza física debilitada causada por el envejecimiento, pueden aparecer infecciones oportunistas.

40 Algunos estafilococos distintos de *Staphylococcus aureus* han adquirido resistencia a meticilina o multirresistencia, y se hace referencia colectivamente a estas bacterias como estafilococos negativos de coagulasa resistentes a meticilina (abreviado de aquí en adelante como "ENCRM") o estafilococos negativos de coagulasa multirresistentes, respectivamente. Como con el caso de los SARM, los fármacos que son eficaces contra ENCRM están limitados si se infecta un paciente inmunocomprometido con ellos. Por tanto, los ENCRM han sido un problema médico.

45 Se hace referencia colectivamente a SARM y ENCRM como estafilococos multirresistentes.

La resistencia de SARM o ENCRM es conocida por ser el resultado de la expresión de una nueva enzima, PBP2', además de los cuatro tipos de proteínas de unión a penicilina (concretamente, PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4) que reticulan cadenas de mureína, que son los elementos constitutivos de la pared celular de estafilococos y que sintetizan la pared celular (Utsui, Y. y Yokota, T.: "Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*.", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28, 397-403, 1985). Las proteínas PBP1 a PBP4 que los estafilococos poseen en común se inactivan como enzimas sintetizadoras de pared celular por antibióticos de penicilina, que son análogos de sustrato, y las bacterias eventualmente mueren cuando la síntesis de las paredes celulares se vuelve impracticable. Sin embargo, los SARM y ENCRM expresan una nueva enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', que exhibe poca afinidad por sustancias antibióticas β -lactámicas, concretamente que no se inactivaría así. Los SARM y ENCRM se considera que proliferan al alterar los papeles en la síntesis de pared celular. La mayoría de SARM y ENCRM adquieren mecanismos de resistencia a otros antibióticos y se vuelven bacterias multirresistentes que son resistentes a muchos antibióticos. Dichas bacterias se consideran estafilococos multirresistentes en lugar de estafilococos que tienen resistencia meramente a antibióticos β -lactámicos.

65 Las técnicas generales para separar e identificar estafilococos implican el uso de frotis de la cavidad nasal, frotis faríngeos, esputo, sangre, pus, heces u otras muestras como muestras clínicas, y se efectúa el cultivo del aislamiento de las mismas con el uso de un medio de agar o medio de agar líquido. Cuando se cultiva en un medio de agar, se seleccionan las colonias sospechosas de ser estafilococos de entre las colonias crecidas, se someten

adicionalmente a cultivo puro y se identifican los estafilococos o *Staphylococcus aureus* por visualización microscópica de imágenes teñidas con Gram o pruebas de carácter bioquímico de la capacidad de producción de coagulasa o la capacidad de degradación de manitol. Cuando se cultivan en medio líquido, se siembra una solución de cultivo en un medio de agar, se cultiva en el mismo para el aislamiento de colonias y se someten también las colonias sospechosas de ser estafilococos a cultivo puro seguido de identificación. Las bacterias que se han identificado como *Staphylococcus aureus* o estafilococos se someten a una prueba de farmacosenibilidad o similar, y se determina si una bacteria de interés es o no SARM, SASM o ENCRM basándose en los resultados de la prueba. Se lleva a cabo generalmente una prueba de farmacosenibilidad por cultivo, tal como una técnica de dilución o prueba de sensibilidad en disco. Dicha prueba de farmacosenibilidad es conocida por requerir una duración de cultivo de 16 a 24 horas (llevaría 3 días o más desde la separación de las muestras clínicas a la determinación si se realizan tanto el cultivo de aislamiento como el cultivo puro) y por producir diferencias en los resultados de la prueba debidas, por ejemplo, a la concentración de bacterias, temperatura de cultivo, composición del medio o fármaco para usar. Por tanto, es necesario que la persona que realice dicha prueba sea altamente experimentada en el procedimiento.

En los últimos años, se ha desarrollado un procedimiento que detecta el gen mecA que codifica PBP2', que es la parte principal del mecanismo de resistencia, mediante cultivo puro, cultivo de aislamiento o directamente a partir de una muestra clínica por PCR para evaluar la resistencia a antibiótico basándose en las condiciones del gen mecA portado en la bacteria analito. Sin embargo, el hecho de que una bacteria porte el gen mecA no significa siempre la expresión de resistencia a antibiótico, y algunas bacterias no han adquirido resistencia a pesar de portar dicho gen.

Como se describe anteriormente, la producción de PBP2' desempeña un papel clave en la expresión de multiresistencia, y la detección de PBP2' en estafilococos puede ser un medio útil para saber si una bacteria de interés ha adquirido resistencia o no.

La PBP2' producida específicamente por bacterias de estafilococos multiresistentes, incluyendo SARM, se detecta mediante un medio inmunológico basado en una reacción de antígeno-anticuerpo, tal como transferencia Western, radioinmunoensayo o prueba de aglutinación en látex en portaobjetos (patente JP n° 3638731). Sin embargo, dichos procedimientos de detección de PBP2' sufren los siguientes problemas. La transferencia Western es complicada en términos de procedimiento, y es difícil procesar rápidamente muchas muestras. El radioinmunoensayo no es práctico desde el punto de vista del ensayo rutinario, puesto que implica el uso de un radioisótopo, requiere la separación UL, que implica separar un complejo de antígeno-anticuerpo de otros antígenos o anticuerpos sin unión durante el ensayo, y requiere varias horas para completar el ensayo debido a la presencia del agente desnaturizante usado para extraer un antígeno de la bacteria en el sistema de reacción. La prueba de aglutinación en látex en portaobjetos requiere la detección de bacterias axénicas debido a las reacciones falsas positivas causadas por bacterias contaminantes (p.ej. reacciones falsas positivas debido a reacciones no específicas) y a la baja sensibilidad. Por tanto, el cultivo debe realizarse al menos dos veces, concretamente cultivo de aislamiento y cultivo puro, que a su vez requieren 2 a 3 días, para completar la determinación, aumenta el coste de medios de cultivo puro y puede causar una reacción falsa positiva debido a la aglutinación después del tiempo de determinación, aunque dicho tiempo puede ser del orden de 3 minutos. Es también laborioso debido a la necesidad de centrifugación para preparar el sobrenadante que contiene PBP2' de las porciones derivadas de pared celular en el momento de pretratamiento de extracción de la PBP2' de la bacteria, que puede contaminar el entorno del laboratorio; implica procedimientos complicados tales como transferencia de un sobrenadante después de centrifugación por pipeteado e implica cocción. Por consiguiente, se ha esperado un procedimiento que pueda detectar rápidamente la PBP2' producida específicamente por una bacteria de estafilococo multiresistente con alta especificidad y sensibilidad como reemplazo de las técnicas de detección convencionales.

Divulgación de la presente invención

Objetivo para lograr por la invención

La presente invención pretende proporcionar un dispositivo de detección inmunocromatográfica que pueda detectar PBP2' producida específicamente por una bacteria de estafilococo multiresistente con alta sensibilidad de manera sencilla y rápida mediante detección inmunocromatográfica para determinar la infección con estafilococo multiresistente, un procedimiento de diagnóstico que usa dicho dispositivo de detección y un kit de diagnóstico que comprende dicho dispositivo de detección.

Medios para lograr el objetivo

Los presentes inventores han realizado estudios concentrados referentes a un procedimiento para extraer PBP2' de una bacteria estafilococo multiresistente y ensayar la misma de manera sencilla y rápida sin procedimientos complicados. Han tenido éxito en el ensayo de PBP2' de manera sencilla con el uso de un dispositivo de detección inmunocromatográfica que usa un reactivo que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a PBP2' y un reactivo de captura que puede unirse específicamente a y capturar un complejo de PBP2' y reactivo marcado. Adicionalmente, han descubierto que la PBP2' podía extraerse y ensayarse sin necesidad de una complicada centrifugación u otro medio tratando la muestra con una solución alcalina antes del ensayo, neutralizando la misma y

aplicando la misma al dispositivo de detección inmunocromatográfica. Adicionalmente, han descubierto que el ensayo puede llevarse a cabo sin causar una reacción falsa positiva aplicando un tensioactivo tal como un tensioactivo anfólico a un sitio de reactivo de captura del dispositivo de detección inmunocromatográfica en el que se ha inmovilizado el reactivo de captura. Esto ha conducido a la terminación de la presente invención.

5

La presente invención proporciona:

[1]. Un procedimiento para detectar una bacteria que produce la proteína de unión a penicilina 2', que comprende la detección de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' mediante detección inmunocromatográfica basada en una reacción de antígeno-anticuerpo, que implica el uso de un dispositivo de detección inmunocromatográfica que comprende sobre un soporte en fase sólida similar a una lámina: un sitio de suministro de muestra en el que se suministra una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2', o una solución de muestra que se deduce que contiene la proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra; un sitio de reactivo marcado que mantiene un reactivo que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a proteína de unión a penicilina 2' de tal manera que el reactivo se extiende por el soporte en fase sólida, y un sitio de reactivo de captura en el que se ha inmovilizado un reactivo de captura que es un anticuerpo que se une específicamente a un sitio que es diferente del sitio al que se une el anticuerpo marcado y captura un complejo de proteína de unión a penicilina 2' y el reactivo marcado, en el que el sitio de reactivo de captura comprende un tensioactivo de tipo sulfobetaína seleccionado del grupo consistente en CHAPS, CHAPSO, sulfobetaína de miristilo (SB3-14) y butanosulfonato de dodecildimetilamonio (DDABS), comprendiendo el procedimiento suministrar la solución de muestra al sitio de suministro de muestra.

10

15

20

25

30

35

[2]. El procedimiento según [1], en el que se añade un anión que tiene una alta tendencia a la ionización a una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' o a una solución de muestra que se deduce que contiene proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra antes de suministrar dicha solución al sitio de suministro de muestra, en el que el anión que tiene una alta tendencia a la ionización se selecciona del grupo consistente en un ión cloruro, un ión bromuro y un ión yoduro.

[3]. El procedimiento según [1] o [2], en el que se añade un catión que tiene una alta tendencia a la ionización a una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' o a una solución que se deduce que contiene proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra antes de suministrar dicha solución al sitio de suministro de muestra, en el que el catión que tiene una alta tendencia a la ionización se selecciona del grupo consistente en un ión de potasio, un ión de calcio, un ión de sodio y un ión de magnesio.

[4]. El procedimiento según una cualquiera de [1] a [3], en el que se pretrata la solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' añadiéndola una solución alcalina y neutralizándola entonces añadiendo una solución neutralizante, y se usa como reactivo marcado y/o reactivo de captura un anticuerpo que se une específicamente a la proteína de unión a penicilina 2' del que se elimina la región Fc.

40

[5]. El procedimiento según [4], en el que se pretrata la solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' suspendiéndola en una solución alcalina y neutralizándola entonces, y se suministra al sitio de suministro de muestra la solución que se deduce que contiene la proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento con la solución de muestra.

45

[6]. Un dispositivo de detección inmunocromatográfica para detectar una bacteria productora de la proteína de unión a penicilina 2', que comprende sobre un soporte en fase sólida similar a una lámina: un sitio de suministro de muestra al que se suministra una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' o una solución de muestra que se deduce que contiene la proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra; un sitio de reactivo marcado que mantiene un reactivo que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a proteína de unión a penicilina 2' de tal manera que el reactivo se extienda por el soporte en fase sólida y un sitio de reactivo de captura en el que se ha inmovilizado un reactivo de captura que es un anticuerpo que se une específicamente a, en un sitio que es diferente del sitio al que se une el anticuerpo marcado, y captura, un complejo de proteína de unión a penicilina 2' y el reactivo marcado, comprendiendo el sitio de reactivo de captura un tensioactivo de tipo sulfobetaína seleccionado del grupo consistente en CHAPS, CHAPSO, sulfobetaína de miristilo (SB3-14) y butanosulfonato de dodecildimetilamonio (DDABS).

50

55

60

[7]. El dispositivo de detección inmunocromatográfica según [6], en el que el reactivo marcado y/o reactivo de captura comprende un anticuerpo que se une específicamente a proteína de unión a penicilina 2' del que se elimina la región Fc.

65

[8]. Un kit para detectar una bacteria productora de proteína de unión a penicilina 2' que comprende: el dispositivo de detección inmunocromatográfica según [6] o [7] y una solución aniónica o catiónica que tiene una alta tendencia a la ionización para añadir a una solución de muestra que se deduce que contiene la bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2', o a una solución de muestra que se deduce que contiene proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra, en el que el anión que tiene una alta tendencia a la ionización se selecciona del grupo consistente en un ión cloruro, un ión bromuro y un ión yoduro, y en el que el catión que tiene una alta tendencia a la ionización se selecciona del grupo consistente en un ión de potasio, un ión de calcio, un ión de sodio y un ión de magnesio.

[9]. El kit según [8], que comprende adicionalmente una solución alcalina para el tratamiento alcalino de una muestra con base y un tampón para neutralización.

Se dan a conocer también en la presente memoria:

[1] Un procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', que comprende la detección de la enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', mediante detección inmunocromatográfica basada en una reacción de antígeno-anticuerpo.

[2] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [1], que implica el uso de un dispositivo de detección inmunocromatográfica que comprende sobre un soporte en fase sólida similar a una lámina: un sitio de suministro de muestra al que se suministra una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', o una solución que se deduce que contiene PBP2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra; un sitio de reactivo marcado que mantiene un reactivo que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a PBP2' de tal manera que el reactivo sea capaz de extenderse por el soporte en fase sólida y un sitio de reactivo de captura en el que se ha inmovilizado un reactivo de captura capaz de unirse específicamente a y capturar un complejo de PBP2' y el reactivo marcado.

[3] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [1] o [2], en el que se pone en contacto PBP2' con el reactivo marcado en un sitio separado del soporte en fase sólida por adelantado, y se suministra al sitio de suministro de muestra una mezcla de muestra-reactivo que comprende una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', o una solución que se deduce que contiene PBP2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra y el reactivo marcado, que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a PBP2'.

[4] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [2] o [3], en el que el reactivo marcado es un portador insoluble al que está unido un anticuerpo.

[5] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [2] a [4], en el que el sitio de reactivo de captura comprende un tensioactivo anfótero, un tensioactivo aniónico y/o un tensioactivo no iónico.

[6] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [2] a [5], en el que el sitio de reactivo de captura comprende un tensioactivo de tipo sulfobetaína.

[7] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [5] o [6], en el que se añade un anión que tiene una alta tendencia a la ionización a una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', o a una solución que se deduce que contiene PBP2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra antes de suministrar dicha solución a un sitio de suministro de muestra.

[8] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [7], en el que el anión que tiene una alta tendencia a la ionización es al menos un anión seleccionado del grupo consistente en un ión cloruro, un ión bromuro y un ión yoduro.

[9] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [5] a [8], en el que se añade un catión que tiene una alta tendencia a la ionización a una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', o a una solución que se deduce que contiene PBP2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra antes de suministrar dicha solución a un sitio de suministro de muestra.

[10] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [9], en el que el catión que tiene una alta tendencia a la ionización es al menos un catión seleccionado del grupo consistente en un ión de potasio, ión de calcio, ión de sodio e ión de magnesio.

- 5 [11] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [1] a [11], que comprende una etapa de pretratamiento de la muestra mediante tratamiento alcalino o neutralización.
- [12] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [11], en el que se lleva a cabo el tratamiento alcalino usando una solución acuosa de hidróxido o carbonato de metal alcalino o una solución acuosa de hidróxido o carbonato de metal alcalinotérreo.
- 10 [13] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [12], en el que el pH de la solución acuosa de hidróxido o carbonato de metal alcalino o de la solución acuosa de hidróxido o carbonato de metal alcalinotérreo es 11 o mayor.
- 15 [14] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [12] o [13], en el que la concentración de hidróxido o carbonato de metal alcalino o hidróxido o carbonato de metal alcalinotérreo está entre 0,01 y 1,0 N.
- 20 [15] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [11] a [14], en el que la solución acuosa después de tratamiento alcalino se neutraliza con un tampón.
- [16] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [1] a [15], en el que el sitio de suministro de muestra comprende fibras de vidrio.
- 25 [17] El procedimiento para detectar una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [1] a [16], en el que la bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', es un estafilococo multirresistente.
- 30 [18] Un dispositivo de detección inmunocromatográfica para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', que comprende sobre un soporte en fase sólida: un sitio de suministro de muestra al que se suministra una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', o una solución que se deduce que contiene PBP2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra; un sitio de reactivo marcado que mantiene un reactivo que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a 'PBP2', de tal manera que el reactivo sea capaz de extenderse por el soporte en fase sólida y un sitio de reactivo de captura en el que se ha inmovilizado un reactivo de captura capaz de unirse específicamente a y capturar un complejo de PBP2' y el reactivo de marcado, comprendiendo el sitio de reactivo de captura un tensioactivo anfófilo, un tensioactivo aniónico y/o un tensioactivo no iónico.
- 35 [19] El dispositivo de detección inmunocromatográfica para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [18], en el que el sitio de reactivo de captura comprende un tensioactivo de tipo sulfobetaína.
- 40 [20] El dispositivo de detección inmunocromatográfica para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [18] o [19], en el que el sitio de suministro de muestra comprende fibras de vidrio.
- 45 [21] El dispositivo de detección inmunocromatográfica para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [18] a [20], en el que la bacteria productora de enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', es un estafilococo multirresistente.
- 50 [22] Un kit para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', que comprende: el dispositivo de detección inmunocromatográfica para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [18] a [21] y una solución aniónica o catiónica que tiene una alta tendencia a la ionización para añadir a la solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', o a una solución que se deduce que contiene PBP2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra.
- 55 [23] El kit para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [22], en el que el anión que tiene una alta tendencia a la ionización es al menos un anión seleccionado del grupo consistente en un ión cloruro, un ión bromuro y un ión yoduro.
- 60 [24] El kit para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [22], en el que el catión que tiene una alta tendencia a la ionización es al menos un catión seleccionado del grupo consistente en un ión de potasio, un ión de calcio, un ión de sodio y un ión de magnesio.
- 65

[25] El kit para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [22] a [24], que comprende adicionalmente una solución alcalina para el tratamiento alcalino de una muestra con base y un tampón para neutralización.

5 [26] El kit para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [25], en el que la solución alcalina es una solución acuosa de hidróxido o carbonato de metal alcalino o una solución acuosa de hidróxido o carbonato de metal alcalinotérrico.

10 [27] El kit para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [26], en el que el pH de la solución acuosa de hidróxido o carbonato alcalino o la solución acuosa de hidróxido o carbonato alcalinotérrico es 11 o mayor.

15 [28] El kit para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según [26] o [27], en el que la concentración de hidróxido o carbonato de metal alcalino o hidróxido o carbonato de metal alcalinotérrico está entre 0,01 y 1,0 N.

20 [29] El kit para detectar una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', según una cualquiera de [22] a [28], en el que la bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', es un estafilococo multirresistente.

Efectos de la invención

25 El uso del dispositivo de detección inmunocromatográfica de la presente invención posibilita la detección de PBP2' con alta sensibilidad. Esto posibilita entonces ensayar una colonia después del cultivo de aislamiento. En consecuencia, puede evaluarse si una bacteria de interés es SARM o ENCRM o no mediante una sola operación de cultivo en 1 día después de la separación de la misma de la muestra clínica. Esto puede reducir notablemente la duración del ensayo y el coste de los medios usados para el cultivo puro. Adicionalmente, el cultivo en sangre (líquida) que se lleva a cabo para ensayar la bacteremia o septicemia de SARM posibilita la detección directa de un medio positivo. Esto posibilita la iniciación de un tratamiento eficaz en una etapa temprana, lo que conduce a una reducción de la duración del tratamiento.

30 También la centrifugación se vuelve innecesaria al conferir efectos de filtración a un miembro de aplicación de muestra en un soporte en el que se ha inmovilizado un anticuerpo. Por tanto, pueden mantenerse las condiciones de laboratorio sanitario.

35 Se impregna un sitio de captura del dispositivo de detección inmunocromatográfica con un tensioactivo seleccionado del grupo consistente en CHAPS, sulfobetaína de miristilo (SB3-14) y butanosulfonato de dodecildimetilamonio (DDABS), de modo que pueda evitarse la unión de bacterias fraccionadas distintas de antígenos al reactivo marcado y/o al sitio de captura; concretamente, pueden evitarse reacciones falsas positivas y puede mejorarse la sensibilidad. Esto hace innecesario el procedimiento de cocción anteriormente necesario en el proceso de pretratamiento bacteriano.

Breve descripción de los dibujos

45 La Fig. 1 muestra una realización del dispositivo de detección de la presente invención que comprende un sitio de reactivo marcado.

50 La Fig. 2 muestra una realización del dispositivo de detección de la presente invención que comprende un sitio de reactivo no marcado.

Descripción de la numeración de referencia

- 1: Un sitio de suministro de muestra
- 2: Un sitio de reactivo marcado
- 55 3: Un sitio de reactivo de captura (anticuerpo de captura)
- 4: Un sitio de control
- 5: Un soporte en fase sólida (membrana de nitrocelulosa)
- 6: Un sitio de absorción (almohadilla absorbente)
- 60 7: Un laminado o carcasa superior

Mejores modos de llevar a cabo la invención

De aquí en adelante, se describe con detalle la presente invención.

65 La presente invención se refiere a un dispositivo de detección inmunocromatográfica de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7 que puede detectar la PBP2' que está presente específicamente en una bacteria productora

de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', tal como un estafilococo multirresistente, con alta sensibilidad de manera sencilla y rápida mediante detección inmunocromatográfica para determinar la infección con una bacteria productora de una enzima productora de pared celular, PBP2', tal como un estafilococo multirresistente, y un kit de diagnóstico de acuerdo con las reivindicaciones 8 y 9. El término "muestra" usado en la presente memoria hace referencia a una solución que se deduce que contiene una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', y más específicamente, una solución que se deduce que contiene una bacteria estafilococo multirresistente, incluyendo una solución de bacterias suspendidas en la misma, que se ha preparado haciendo un frotis en un medio de crecimiento tal como medio de agar-sangre, medio de agar normal, medio de agar de infusión cardiaca, medio de agar de cerebro-corazón, medio de agar con digestión de soja/caseína, medio de agar de chocolate, medio de agar de sal de manitol que contiene yema de huevo o medio de selección de SARM, con una sustancia analito tal como orina, pus, líquido cefalorraquídeo, material secretado o fluido de punción obtenido de un paciente sospechoso, y cultivando la misma en condiciones aeróbicas a 35 a 37 °C durante 18 o horas o más; y a una solución de cultivo resultante del cultivo agitado en medio de cultivo líquido, medio de cultivo sanguíneo o similar en condiciones aeróbicas a 35 a 37 °C durante 18 horas o más. El término hace referencia también a un extracto que se deduce que contiene PBP2' liberada de la pared celular debido a pretratamiento de dicha suspensión de bacterias. La "bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2'" incluye estafilococo multirresistente y "estafilococo multirresistente" incluye *Staphylococcus aureus* multirresistente (SARM) y estafilococos negativos de coagulasa multirresistentes (ENCRM). Puede ser también una muestra una solución de sustancia analito, tal como orina, pus, líquido cefalorraquídeo, material secretado, fluido de punción u otra muestra obtenida de un paciente sospechoso suspendida directamente en solución salina fisiológica o tampón fosfato. Desde el punto de vista de la sensibilidad de detección, es preferible el uso de una solución que contiene bacterias cultivadas de la manera anteriormente descrita.

El dispositivo de detección inmunocromatográfica de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7 es un artículo de la prueba inmunocromatográfica. Por ejemplo, dicho dispositivo está compuesto como se muestra en la Fig. 1. Dicho dispositivo comprende sobre un soporte en fase sólida similar a una lámina; un sitio de suministro de muestra 1 al que se suministra una muestra; un sitio de reactivo marcado 2 que mantiene un reactivo, que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a PBP2' de tal manera que el reactivo sea capaz de extenderse por el soporte en fase sólida y un sitio de reactivo de captura 3 en el que se ha inmovilizado un reactivo de captura capaz de unirse específicamente a y capturar un complejo de PBP2' y el reactivo marcado. Cuando se suministra una muestra al sitio de suministro de muestra 1, la muestra pasa a través del sitio de reactivo marcado 2 y el sitio de reactivo de captura 3 en ese orden. En la presente invención, puede suministrarse al sitio de suministro de muestra 1 una mezcla de una muestra y un reactivo que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a PBP2'. En dicho caso, puede omitirse el sitio de reactivo marcado 2 sobre el soporte en fase sólida (Fig. 2). Cuando la mezcla de una muestra y un reactivo que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a PBP2' se va a suministrar al sitio de suministro de muestra 1, la PBP2' contenida en la muestra entra en contacto con el reactivo marcado en un sitio separado del soporte en fase sólida por adelantado. La frase "un analito entra en contacto con un reactivo marcado en un sitio separado del soporte en fase sólida por adelantado" hace referencia a condiciones tales que el reactivo marcado no está contenido sobre el soporte en fase sólida, ni está en contacto con el soporte en fase sólida, y tales que no está incluido un líquido en un sitio que pueda comunicar con el soporte en fase sólida, tal como un sitio de suministro de muestra del dispositivo de detección inmunocromatográfica. En dicho caso, un analito entra en contacto con el reactivo marcado por adelantado fuera del soporte en fase sólida o sitio que está en contacto con el soporte en fase sólida.

El dispositivo de detección inmunocromatográfica de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7 puede comprender adicionalmente un reactivo de control y un sitio de absorción. El reactivo de control no está particularmente limitado. Por ejemplo, puede usarse una sustancia a la que se une un anticuerpo en un reactivo marcado. Puede inmovilizarse un reactivo de control en un sitio más adelante del sitio de reactivo de captura. En la Fig. 1, el sitio de control 4 corresponde a dicho sitio. Un sitio de absorción es capaz de absorber un líquido de tal modo que absorbe la muestra que ha pasado a través del sitio de captura para regular el flujo de la muestra. Dicho sitio puede proporcionarse en el sitio más bajo del dispositivo de detección. En la Fig. 1, el sitio de absorción 6 corresponde a dicho sitio. Por ejemplo, puede usarse un sitio de absorción hecho de papel como una almohadilla absorbente.

En el dispositivo de detección inmunocromatográfica de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7, un sitio de suministro de muestra puede estar constituido por un extremo de un soporte en fase sólida como tal, o puede estar constituido por un miembro diferente de un soporte en fase sólida. En el caso de la segunda constitución, se proporciona un sitio de suministro de muestra en contacto con un soporte en fase sólida, de modo que la solución pueda extenderse y migrar al soporte en fase sólida con la ayuda de flujo capilar, para que un sitio de suministro de muestra absorba en primer lugar una muestra, o una mezcla de muestra y reactivo marcado, y suministre entonces la muestra o mezcla absorbida al soporte en fase sólida. Los ejemplos de miembros distintos de un soporte en fase sólida incluyen, pero sin limitación, miembros compuestos de polímeros naturales o sintéticos de nitrocelulosa, celulosa acetato, nailon, polietersulfona, polivinilalcohol, poliéster, fibra de vidrio, poliolefina, celulosa o poliestireno y una mezcla de dichas sustancias.

65

El "reactivo marcado" del dispositivo de detección inmunocromatográfica de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7 es un conjugado de un anticuerpo que se une específicamente a PBP2' y una sustancia marcadora adecuada. Los ejemplos de sustancia marcadora incluyen coloides metálicos tales como coloide de oro, coloides no metálicos tales como coloide de selenio, y sustancias insolubles tales como partículas de resina coloreada. En la presente invención, se hace referencia ocasionalmente a dichas sustancias marcadoras como "portadores insolubles". Preferiblemente, los portadores insolubles están cargados negativamente. En general, un reactivo marcado se impregna con un miembro diferente de un soporte en fase sólida, se seca y se dispone entonces en un sitio continuo del soporte en fase sólida. Como alternativa, el soporte en fase sólida puede aplicarse directamente al reactivo marcado y secarse entonces. Cuando la muestra alcanza un sitio de reactivo marcado que contiene un reactivo marcado, se disuelve el reactivo marcado en la muestra y la solución resultante puede entonces extenderse por el soporte en fase sólida. Específicamente, se mantiene un reactivo marcado en un sitio de reactivo marcado de manera extensible por el soporte.

El reactivo de captura del dispositivo de detección inmunocromatográfica de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente a PBP2'; un sitio de reactivo de captura puede unirse específicamente a y capturar un complejo de PBP2' y un reactivo marcado, y se forma entonces un complejo de reactivo marcado/PBP2'/reactivo de captura. En general, se prepara un reactivo de captura mediante la aplicación directa de un soporte en fase sólida, seguido de secado, aunque el procedimiento de preparación no está limitado al mismo. Puede impregnarse con el reactivo de captura un miembro distinto que el soporte en fase sólida y secarse entonces, y puede disponerse el resultado sobre el soporte en fase sólida. El procedimiento para inmovilizar un reactivo de captura sobre un soporte en fase sólida no está limitado a la adsorción. La inmovilización puede llevarse a cabo mediante una técnica convencional, tal como unión química con el uso de un grupo funcional tal como un grupo amino o carboxilo.

El anticuerpo para usar como reactivo de captura puede ser el mismo anticuerpo para usar como reactivo marcado. Sin embargo, cuando hay solo un sitio que se une a dicha sustancia en PBP2', no se formaría un complejo de reactivo marcado/PBP2'/reactivo de captura. En dicho caso, por consiguiente, se requiere que un reactivo de captura se una a un sitio de PBP2' que sea diferente del sitio al que se une un reactivo marcado.

El soporte en fase sólida puede ser de cualquier sustancia, a condición de que una muestra pueda absorberse por dicho soporte y fluidificarse mediante el fenómeno capilar. Por ejemplo, se selecciona un soporte del grupo consistente en un polímero natural o sintético de nitrocelulosa, celulosa acetato, nailon, polietersulfona, polivinilalcohol, poliéster, fibra de vidrio, poliolefina, celulosa o poliestireno y una mezcla de dichas sustancias. El soporte en fase sólida tiene preferiblemente forma de tiras.

La enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', que se produce específicamente por una bacteria estafilococo multirresistente, está presente en una membrana celular localizada dentro de la pared celular. El pretratamiento o rotura o fusión de la pared celular de estafilococo multirresistente facilita que un reactivo de captura y un reactivo marcado reconozcan PBP2'. Como reactivo de extracción para romper o fundir la pared celular de estafilococos multirresistentes, es conocida una enzima digestora de la pared celular o un tensioactivo dado que tiene acción bactericida, tal como un tensioactivo catiónico o tensioactivo anfófilo dado. El uso de dichos reactivos es difícil porque dichos reactivos son caros e inhiben fuertemente la reacción de antígeno-anticuerpo en el momento de la detección inmunocromatográfica, y por otras razones. Por tanto, el uso de una solución alcalina diluida es preferible como reactivo de extracción para PBP2' en el momento de la detección inmunocromatográfica de la presente invención. Los ejemplos específicos de ella incluyen una solución acuosa de hidróxido o carbonato de metal alcalino 0,01 a 1,0 N y una solución acuosa de hidróxido o carbonato de metal alcalinotérreo 0,01 a 1,0 N. El pH de dicha solución alcalina diluida es preferiblemente 11 o mayor.

Cuando se pretrata una solución que contiene bacterias con una solución alcalina diluida como se describe anteriormente, se inhibiría una reacción de antígeno-anticuerpo si el pH permaneciera a 11 o mayor después del pretratamiento. Por tanto, se requiere la neutralización de la solución alcalina. La solución de neutralización no está particularmente limitada, y los ejemplos de la misma incluyen tampón fosfato, tampón Tris y tampón Good, tales como MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, tricina, bicina o TAPS, que exhiben capacidad de tamponación al pH óptimo del sistema de reacción, concretamente entre 6 y 8, para detección inmunocromatográfica. En la presente invención, el pretratamiento de bacterias es un proceso de extracción de una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', y más particularmente PBP2' como antígeno, mediante exposición de una solución de bacterias que se deduce que contienen estafilococos multirresistentes a condiciones alcalinas. "Pretratamiento" hace referencia también a un proceso de neutralización de las condiciones alcalinas. El pretratamiento puede llevarse a cabo añadiendo una solución alcalina a una solución de muestra que comprende bacterias para alcalinización, y añadiendo entonces una solución neutralizante a la misma. Como alternativa, las bacterias recogidas con el uso de un asa de platino o hisopo de algodón pueden suspenderse directamente en una solución alcalina, y puede añadirse entonces solución neutralizante. Las cantidades de dichas soluciones para añadir no están limitadas, y dichas cantidades pueden determinarse para llevar el pH de la solución de muestra neutralizada a alrededor de 6 a 9. También puede impregnarse un sitio de suministro de muestra con una solución neutralizante por adelantado y entonces secarse.

En la presente invención, la solución de bacterias puede pretratarse y entonces neutralizarse, pueden añadirse a la misma aditivos tales como sal, tensioactivo, proteína, polímero, compuesto ácido y compuesto básico, puede mezclarse concienzudamente el resultado y puede suministrarse entonces la muestra al sitio de suministro de muestra del dispositivo de detección inmunocromatográfica. Estos aditivos pueden potenciar la sensibilidad de una reacción de antígeno-anticuerpo y pueden reducir las reacciones falsas positivas (p.ej. reacciones falsas positivas debidas a reacciones no específicas). Adicionalmente, dichos aditivos pueden añadirse a la solución alcalina diluida o solución neutralizante anteriormente mencionadas por adelantado para reducir las etapas de procedimiento.

Cuando se pretende la detección estafilococos multirresistentes, pueden unirse ocasionalmente sustancias derivadas de estafilococos no multirresistentes (SASM o ENCSM) o bacterias distintas de estafilococos a anticuerpos (concretamente, como un reactivo marcado y un reactivo de captura) y pueden mostrar resultados falsos positivos. Por tanto, con el uso de un reactivo de detección de PBP2' usado para el ensayo de aglutinación en látex, los agentes causantes de falsos positivos, tales como proteína A, que están presentes en la pared celular de *Staphylococcus aureus* y exhiben la capacidad de unirse a IgG, tenían que inactivarse por coacción de la solución de bacterias en presencia de un reactivo alcalino, los residuos después del fraccionamiento celular después de centrifugar tenían que eliminarse y tenía que usarse para ensayo el sobrenadante después de la centrifugación. Mediante la detección inmunocromatográfica según la presente divulgación, puede impregnarse un sitio de reactivo de captura del dispositivo de detección inmunocromatográfica con un tensioactivo para inhibir la unión de un agente causante de falsos positivos a un anticuerpo de captura, sin inactivar el agente causante de falsos positivos por coacción. Es preferible un tensioactivo anfófilico, un tensioactivo aniónico o un tensioactivo no iónico, e incluir uno de ellos puede ser suficiente. La inhibición de la unión de un agente causante de falsos positivos a un anticuerpo de captura con la ayuda de un tensioactivo se considera que es el resultado de enmascarar por un tensioactivo un sitio de anticuerpo al que se une un agente causante de falsos positivos. Por consiguiente, se considera que son más eficaces los tensioactivos con mayores pesos moleculares y/o mayores números de estructuras cíclicas. Cuando se usa cualquiera de los siguientes tensioactivos no iónicos, por ejemplo, se inhiben más los resultados falsos positivos originados por *Staphylococcus aureus* no multirresistente que es no multirresistente en comparación con el caso en que no se añadía tensioactivo: un tensioactivo no iónico con un peso molecular de 646 y una sola estructura de anillo de 6 miembros (nombre comercial: Tx100; Nacalai Tesque); un tensioactivo anfófilico que tiene un peso molecular de 364 sin una estructura de anillo de 6 miembros (nombre comercial: SB3-14; Calbiochem); un tensioactivo anfófilico que tiene un peso molecular de 615, tres estructuras de anillo de 6 miembros y una sola estructura de anillo de 5 miembros (nombre comercial: CHAPS; DOJINDO LABORATORIES); o un tensioactivo no iónico que tiene un peso molecular de 878 y tres estructuras de anillo de 6 miembros y una sola estructura de anillo de 5 miembros (nombre comercial: BIGCHAP, DOJINDO LABORATORIES). Los efectos de inhibición logrados con el uso de CHAPS y BIGCHAP fueron mayores que los logrados con el uso de Tx100 y SB3-14. Por consiguiente, se considera preferible que el peso molecular del tensioactivo sea de 300 o más, y más preferiblemente de 600 o más, y se considera preferible que el tensioactivo comprenda el mayor número de estructuras cíclicas, tales como anillos de 6 miembros. Con los fines de inhibir las reacciones falsas positivas, es preferible el uso de un tensioactivo que está cargado de la misma manera que en el caso de un portador insoluble. Cuando un portador insoluble es látex o coloide de oro cargado negativamente, es preferible que el tensioactivo esté también cargado negativamente.

Una reacción falsa positiva resultante de la proteína A presente en la pared celular de *Staphylococcus aureus* es un problema particularmente grave. La proteína A se une fuertemente a la región Fc de la inmunoglobulina G. Se usan anticuerpos que reconocen PBP2' como reactivos marcados y reactivos de captura. Los anticuerpos pueden ser de inmunoglobulina G o inmunoglobulina M, sin limitación particular. Cuando se usa inmunoglobulina G, se usa dicho anticuerpo eliminando la región Fc, y se combina una región de reactivo de captura con el tensioactivo anteriormente mencionado anteriormente. Por tanto, puede evitarse una reacción falsa positiva causada por la proteína A. La región Fc puede eliminarse fácilmente con el uso de una enzima degradante conocida, tal como pepsina o papaína.

La proteína G contenida en la pared celular de estreptococos del grupo G se une específicamente también a la región Fc de la inmunoglobulina G. Cuando una solución de muestra contiene estreptococos del grupo G, por consiguiente, la proteína G puede reaccionar no específicamente con un reactivo marcado o reactivo de captura, como con el caso de proteína A. Dicha reacción falsa positiva puede evitarse también de la manera anteriormente descrita.

Entre los tensioactivos para aplicar al sitio de reactivo de captura, las propiedades de un tensioactivo iónico se afectan particularmente por la concentración de aniones o cationes en la solución que pasa a través de la región de reactivo de captura. Esto requiere la determinación de la concentración óptima de aniones o cationes en la solución de acuerdo con el tipo, concentración, propiedades u otras condiciones del tensioactivo para usar. Los ejemplos de aniones incluyen un ión cloruro, un ión bromuro y un ión yoduro que tienen una alta tendencia a la ionización. Los ejemplos de cationes incluyen un ión de potasio, un ión de calcio, un ión de sodio y un ión de magnesio que tienen una alta tendencia a la ionización. En este caso, puede usarse una pluralidad de aniones o cationes.

La sensibilidad de detección puede mejorarse añadiendo un tensioactivo que contiene una región de sulfobetaína a un sitio de reactivo de captura, que es el procedimiento según la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones 1-5. Puesto que no pudo detectarse PBP2' con alta sensibilidad con el uso de un reactivo de detección de PBP2' mediante el ensayo de aglutinación en látex, tuvo de romperse la pared celular mediante coacción

de una solución de bacterias en presencia de un reactivo alcalino para extraer completamente PBP2'. Según la presente divulgación, se mejora la sensibilidad de detección con la adición de un tensioactivo que contiene una región de sulfobetaína, que posibilitaba la detección de PBP2' con alta sensibilidad incluso cuando la elución de PBP2' es incompleta en ausencia de cocción. La cocción en presencia de un reactivo alcalino causaría la degradación de PBP2', o causaría la desensibilización mediante desnaturalización de un sitio de reconocimiento de anticuerpo debido a cambios estructurales; sin embargo, la sensibilidad de detección puede mantenerse ventajosamente en ausencia de cocción.

Los ejemplos de tensioactivos que contienen cada uno una región de sulfobetaína incluyen CHAPS, CHAPSO, sulfobetaína de miristilo (SB3-14) y butanosulfonato de dodecildimetilamonio (DDABS).

Se añaden un tensioactivo para inhibir la unión del agente causante de falsos positivos a un anticuerpo de captura y un tensioactivo para mejorar la sensibilidad a un reactivo de captura por adelantado cuando se va a inmovilizar un reactivo de captura en un sitio de reactivo de captura. Puede usarse cualquiera o ambos de un tensioactivo para inhibir la unión del agente causante de falsos positivos a un anticuerpo de captura y un tensioactivo de tipo sulfobetaína capaz de mejorar la sensibilidad. Como alternativa, el tensioactivo para inhibir la unión del agente causante de falsos positivos a un anticuerpo de captura puede ser un tensioactivo de tipo sulfobetaína, y puede mejorarse la sensibilidad en dicho caso.

Adicionalmente, el procedimiento de la presente divulgación puede producir el efecto de inhibir la unión de un agente causante de falsos positivos a un anticuerpo de captura y el efecto de mejorar la sensibilidad al añadir un tensioactivo que contiene una región de sulfobetaína con un peso molecular preferiblemente de 300 o más, y más preferiblemente de 600 o más, a un sitio de reactivo de captura. Específicamente, son preferibles CHAPS y SB3-14, siendo particularmente preferible CHAPS. Puede añadirse una pluralidad de tensioactivos al sitio de reactivo de captura.

Cuando se añade un anión o catión como se describe anteriormente, dicho anión o catión puede añadirse a una solución de muestra que se deduce que contiene un estafilococo multirresistentes o a una solución de muestra que se deduce que contiene PBP2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra.

El procedimiento de la presente divulgación incluye adicionalmente un procedimiento de prevención de que un agente causante de falsos positivos alcance el sitio de reactivo de captura, previniendo así las influencias de dicho agente causante de falsos positivos. Por ejemplo, un agente causante de falsos positivos puede eliminarse en un sitio por delante del sitio de reactivo de captura en el dispositivo de la presente invención. Como medio para eliminar el agente causante de falsos positivos, un sitio de suministro de muestra del dispositivo de detección inmunocromatográfica comprende preferiblemente fibras de vidrio. El agente causante de falsos positivos derivado de bacterias se adsorbe por las fibras de vidrio, que inhiben que el agente causante de falsos positivos pase a través del reactivo de captura. Esto puede inhibir en consecuencia la reacción falsa positiva.

El procedimiento de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 es un procedimiento de detección basado en una reacción de antígeno-anticuerpo que usa una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', como antígeno y un anticuerpo que reacciona con la misma. Si está presente en la muestra una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', por consiguiente, puede detectarse PBP2' mediante el procedimiento de la presente invención. En general, se produce específicamente una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', mediante un estafilococo multirresistente, y está presente específicamente en dicha bacteria.

Actualmente, no es conocida la existencia de bacterias productoras de PBP2' distintas de estafilococos multirresistentes. En la presente descripción, el término "estafilococos multirresistentes" se usa ocasionalmente como ejemplo específico en lugar del término "una bacteria productora de una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2'". Dicho uso no pretende limitar la bacteria a un "estafilococo multirresistente". Este término puede leerse como "una bacteria que produce una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2'" dentro del alcance que permite poner en marcha el procedimiento de la presente invención. Es decir, pueden detectarse bacterias productoras de PBP2' distintas de estafilococos multirresistentes mediante el procedimiento de la presente invención. Adicionalmente, pueden detectarse bacterias que contienen cada una una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', mediante el procedimiento de la presente invención. En general, se considera que la enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', está presente específicamente en una membrana celular dentro de la pared celular de un estafilococo multirresistente. El procedimiento de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 implica el uso de un reactivo de extracción de PBP2' usado para el pretratamiento de rotura o fusión de la membrana celular. Por consiguiente, las bacterias que comprenden cada una una enzima sintetizadora de pared celular, PBP2', dentro de la pared celular pueden detectarse eficazmente por el procedimiento de la presente invención.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se describe con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos, aunque la presente invención no está limitada a los mismos.

Ejemplo 1: Detección de PBP2' en SARM mediante detección inmunocromatográfica (Fig. 1)

(1) Preparación y secado de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpo

5 Se trató un anticuerpo monoclonal anti-PBP2' con pepsina de acuerdo con la técnica convencional para obtener F(ab')₂. Se sometió el resultado a sensibilización de partículas de látex de 0,4 µm, y se pulverizó la solución resultante sobre una tela de poliestireno no tejida. Se secó entonces el resultado a presión reducida durante 1 hora en un dispositivo de descompresión para preparar una almohadilla de anticuerpo de látex seca. Se cortó la almohadilla a intervalos de 4 mm para uso y se usó como el sitio marcado 2.

10 (2) Preparación del dispositivo de detección inmunocromatográfica

15 Se trató con pepsina un segundo anticuerpo monoclonal anti-PBP2' que tenía un sitio de reconocimiento diferente del anticuerpo monoclonal anti-PBP2' usado para sensibilización de látex de acuerdo con la técnica convencional para obtener F(ab')₂. Se diluyó el resultado con tampón citrato (pH 6) que contenía 0,075 % de CHAPS, se aplicó el resultado a una membrana de nitrocelulosa (soporte en fase sólida 5) y se secó concienzudamente la membrana (sitio de reactivo de captura 3). Como reactivo de control, se aplicó IgG anti-ratón a una membrana de nitrocelulosa de la misma manera y se secó concienzudamente (sitio de control 4).

20 Se proporcionaron un sitio de reactivo de captura 3 y un soporte en fase sólida 5, incluyendo un sitio de control 4, sobre una lámina hidrófoba 7, y un sitio de reactivo de control 2, una fibra de vidrio como sitio de suministro de muestra 1 y un papel de filtro como sitio de absorción 6 en cualquier posición.

25 (3) Pretratamiento de muestra

Se cultivaron *Staphylococcus aureus* (14 bacterias) en medio de agar sanguíneo a 35 °C durante una noche, y se suspendió un asa de siembra de cultivo directamente en NaOH 0,2 N. De forma similar, se recogió una colonia y se suspendió entonces en 100 µl de NaOH 0,2 N. Se neutralizó entonces el resultado con 50 µl de tampón Tris-HCl 0,6 M que contenía un tensioactivo no iónico, seroalbúmina bovina e IgG de conejo.

30 (4) Ensayo

35 Se introdujo el dispositivo de detección inmunocromatográfica en un tubo de 1,5 ml que contenía la solución después del pretratamiento de muestras, se evaluó el desarrollo de color de un reactivo de captura 3 a simple vista 10 minutos después y se identificó como positivo el reactivo de captura que había desarrollado color. El reactivo que no había desarrollado color se identificó como negativo.

(5) Prueba de sensibilidad a fármaco

40 Se suspendieron en una solución de cloruro de sodio al 0,9 % esterilizada bacterias cultivadas de la misma manera que en (3) y se ajustó la absorbancia a 578 nm de la solución a 0,3. Se sembró la solución resultante en medio de agar de Muller-Hinton que contenía oxacilina 6 µg/ml y 4 % de cloruro de sodio, se realizó el cultivo a 35 °C durante 24 horas, se determinó que la bacterias que había crecido eran SARM y que las bacterias que no habían crecido eran SASM.

45 (6) Resultados

Se muestran los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1

Un asa de siembra

		Sensibilidad a fármaco		Total
		SARM	SASM	
Presente invención	SARM	4	0	4
	SASM	0	10	10
	Total	4	10	14

Una colonia

		Sensibilidad a fármaco		Total
		SARM	SASM	
Presente invención	SARM	4	0	4
	SASM	0	10	10
	Total	4	10	14

55 Como resulta evidente por la Tabla 1, la tasa de concordancia positiva entre SARM y SASM es de 100 % (4/4) y la tasa de concordancia negativa entre ellos es de 100 % (10/10). Esto indica que la tasa de concordancia en conjunto

es de 100 % (14/14). Estos resultados representan la superioridad de la presente invención frente a técnicas convencionales.

Ejemplo 2: Efecto de la adición de tensioactivo al sitio de reactivo de captura

5 (1) Preparación y secado de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpo

Se usaron las partículas de látex preparadas en el Ejemplo 1.

10 (2) Preparación del dispositivo de detección inmunocromatográfica

Se preparó el dispositivo de la misma manera que en el Ejemplo 1. En este caso, se prepararon y usaron un dispositivo que comprendía un sitio de reactivo de captura y CHAPS, Tx100, SB3-14, BIGCHAP y DTAC al 0,05 % (cloruro de dodeciltrimetilamonio) añadidos al mismo y un dispositivo que no comprendía dichas sustancias.

15 (3) Pretratamiento de muestra

Se cultivaron de la misma manera que en el Ejemplo 1 una bacteria que se había evaluado como farmacosenible, concretamente SASM, y una bacteria que se había evaluado como resistente, concretamente SARM, mediante la prueba de farmacosenibilidad. Se recogieron 2 y 3 asas de siembra de SASM y un asa de siembra de SARM y pretrataron entonces.

(4) Ensayo

25 Se ensayó un SASM de la misma manera que en el Ejemplo 1 sin dilución. Adicionalmente, se sometió el SARM a una dilución en dos etapas con una mezcla que comprendía NaOH 0,2 N y tampón Tris-HCl 0,6 M (que contenía un tensioactivo no iónico, seroalbúmina bovina e IgG de conejo) 2:1 y se ensayaron 150 µl de los mismos diluidos al menos 1024 veces de la misma manera que en el Ejemplo 1.

30 (5) Resultados

Se compararon los resultados logrados con el dispositivo que comprende un tensioactivo añadido a un sitio de reactivo de captura y los resultados logrados con el dispositivo que no comprende tensioactivo. Se muestran en la Tabla 2 los resultados logrados con el uso de SASM. Se representan los resultados negativos por “-” y el grado de reacción falsa positiva se representa por el número de “+”. Se muestran en la Tabla 3 los resultados logrados con el uso de SARM. Se representa un resultado negativo por “-” y se representa un resultado positivo por “+”.

Tabla 2

SASM

	Sin adición	Tx100	CHAPS	SB3-14	BIGCHAP	DTAC
SASM (2 asas)	+	-	-	-	-	+
SASM (3 asas)	++	+	-	+	-	++

40 Cuando no se añadía tensioactivo y se añadía un tensioactivo catiónico, DTAC, se lograba un resultado falso positivo con 2 asas de SASM. Cuando se añadía Tx100 o SB3-14 que tienen un peso molecular relativamente pequeño, 3 asas de los mismos causaban una reacción falsa positiva, aunque el grado de la misma no era tan fuerte como el logrado cuando no se añadía un tensioactivo o cuando se añadía DTAC. Cuando se añadían CHAPS o BIGCHAP que tienen un peso molecular relativamente grande, 2 y 3 asas de los mismos procuraban un resultado negativo.

50 Como resulta evidente por la Tabla 2, la adición de un tensioactivo no iónico, concretamente Tx100 o BIGCHAP, o un tensioactivo anfotérico, concretamente CHAPS o SB3-14, a un sitio de reactivo de captura puede inhibir una reacción falsa positiva originada por SASM. También CHAPS o BIGCHAP, que comprenden un gran número de estructuras cíclicas y tienen un gran peso molecular, pueden inhibir más eficazmente una reacción falsa positiva. Estos resultados demuestran la superioridad de la adición de un tensioactivo a un sitio de reactivo de captura.

Tabla 3

55 SARM

	Sin adición	Tx100	CHAPS	SB3-14	BIGCHAP	DTAC
1:1024	+	+	+	+	+	+ (falso positivo)
1:2048	-	-	+	+	-	+ (falso positivo)
1:4096	-	-	-	-	-	+ (falso positivo)

La sensibilidad de detección mejoró con la adición de CHAPS o SB3-14 a un sitio de reactivo de captura. Los resultados logrados con la adición de DTAC se consideraron que constituyen un falso positivo.

5 Como resulta evidente por la Tabla 3, la adición de un tensioactivo de tipo sulfobetaína, concretamente SB3-14 o CHAPS, a un sitio de reactivo de captura puede mejorar la sensibilidad, en comparación con los casos en que no se añadía tensioactivo o se añadía un tensioactivo de tipo no sulfobetaína, concretamente Tx100 o BIGCHAP. Estos resultados demuestran la superioridad de la adición de un tensioactivo de tipo sulfobetaína a un sitio de reactivo de captura.

10 Los resultados del Ejemplo 2 demuestran que CHAPS muestra particularmente efectos satisfactorios de inhibición de una reacción falsa positiva y aquellos de mejorar la sensibilidad, y que CHAPS es por tanto particularmente útil.

Ejemplo 3: Detección de PBP2' en ENCRM mediante detección inmunocromatográfica

(1) Preparación y secado de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpo

15 Se usaron las partículas de látex preparadas en el Ejemplo 1.

(2) Preparación del dispositivo de detección inmunocromatográfico

20 Se preparó el dispositivo de la misma manera que en el Ejemplo 1.

(3) Pretratamiento de muestra

25 Entre los estafilococos que exhiben propiedades de estafilococos por tinción Gram y que se habían evaluado como positivos por una prueba de catalasa y como negativos por una prueba de coagulasa, se cultivaron dos bacterias que se habían evaluado como sensibles a meticilina, concretamente ENCSM, mediante una prueba de farmacosenibilidad, y una bacteria que se había evaluado como resistente a meticilina, concretamente ENCRM, mediante una prueba de farmacosenibilidad, de la misma manera que en el Ejemplo 1, se recogió un asa de siembra de las mismas y se sometió entonces a pretratamiento.

30 (4) Ensayo

Se realizó el ensayo de la misma manera que en el Ejemplo 1.

(5) Prueba de farmacosenibilidad

35 Se realizó la prueba de la misma manera que en el Ejemplo 1.

(6) Resultados

40 Se muestran los resultados en la Tabla 4. Se representan los resultados de la prueba de farmacosenibilidad como sigue: S: sensibilidad; R: resistencia; +: resultado positivo y -: resultado negativo.

Tabla 4

	Prueba de farmacosenibilidad	Presente invención
Cepa A	S	-
Cepa B	S	-
Cepa C	R	+

45 Las dos cepas que se habían evaluado como sensibles, concretamente ENCSM, mediante la prueba de farmacosenibilidad mostraron resultados negativos, y una cepa que se había evaluado como resistente, concretamente ENCRM, mediante la prueba de sensibilidad a fármaco mostró resultados positivos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar una bacteria que produce proteína de unión a penicilina 2', que comprende la detección la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' mediante detección inmunocromatográfica basada en una reacción de antígeno-anticuerpo, que implica el uso de un dispositivo de detección inmunocromatográfica que comprende sobre un soporte en fase sólida similar a una lámina: un sitio de suministro de muestra al que se suministra una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' o una solución de muestra que se deduce que contiene una proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra; un sitio de reactivo marcado que mantiene un reactivo que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a proteína de unión a penicilina 2' de tal manera que el reactivo se extienda por el soporte en fase sólida y un sitio de reactivo de captura en que se ha inmovilizado un reactivo de captura que es un anticuerpo que se une específicamente a un sitio que es diferente del sitio al que se une el anticuerpo marcado y que captura un complejo de proteína de unión a penicilina 2' y reactivo marcado; en el que el sitio de reactivo de captura comprende un tensoactivo de tipo sulfobetaina seleccionado del grupo consistente en CHAPS, CHAPSO, sulfobetaina de miristilo (SB3-14) y butanosulfonato de dodecildimetilamonio (DDABS), comprendiendo el procedimiento suministrar la solución de muestra al sitio de suministro de muestra.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que se añade un anión que tiene una alta tendencia a la ionización a una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' o a una solución de muestra que se deduce que contiene proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra antes del suministro de dicha solución a un sitio de suministro de muestra, en el que el anión que tiene una alta tendencia a la ionización se selecciona del grupo consistente en un ión cloruro, un ión bromuro y un ión yoduro.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que se añade un catión que tiene una alta tendencia a la ionización a una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' o a una solución que se deduce que contiene la proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra antes del suministro de dicha solución a un sitio de suministro de muestra, en el que el catión que tiene una alta tendencia a la ionización se selecciona del grupo consistente en un ión de potasio, un ión de calcio, un ión de sodio y un ión de magnesio.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se pretrata la solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' añadiéndola una solución alcalina y neutralizándola entonces por adición de una solución neutralizante, y en el que se usa como reactivo marcado y/o reactivo de captura un anticuerpo que se une específicamente a proteína de unión a penicilina 2' del que se elimina la región Fc.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que se pretrata la solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizada de pared celular proteína de unión a penicilina 2' suspendiéndola en una solución alcalina y neutralizándola entonces, y comprendiendo el procedimiento suministrar la solución que se deduce que contiene la proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de la solución de muestra a un sitio de suministro de muestra.
6. Un dispositivo de detección inmunocromatográfica para detectar una bacteria productora de proteína de unión a penicilina 2', que comprende sobre un soporte en fase sólida similar a una lámina: un sitio de suministro de muestra al que se suministra una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2', o una solución de muestra que se deduce que contiene proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra; un sitio de reactivo marcado que mantiene un reactivo que es un anticuerpo marcado que se une específicamente a proteína de unión a penicilina 2' de tal manera que el reactivo se extienda por el soporte en fase sólida y un sitio de reactivo de captura en que se ha inmovilizado un reactivo de captura que es un anticuerpo que se une específicamente a un sitio que es diferente del sitio al que se une el anticuerpo marcado y que captura un complejo de proteína de unión a penicilina 2' y reactivo marcado, comprendiendo el sitio de reactivo de captura un tensoactivo de tipo sulfobetaina seleccionado del grupo consistente en CHAPS, CHAPSO, sulfobetaina de miristilo (SB3-14) y butanosulfonato de dodecildimetilamonio (DDABS).
7. El dispositivo de detección inmunocromatográfica según la reivindicación 6, en el que el reactivo marcado y/o reactivo de captura comprende un anticuerpo que se une específicamente a proteína de unión a penicilina 2' del que se elimina la región Fc.
8. Un kit para detectar una bacteria productora de proteína de unión a penicilina 2' que comprende: el dispositivo de detección inmunocromatográfica según la reivindicación 6 o 7 y una solución aniónica o catiónica que tiene una alta tendencia a la ionización para añadir a una solución de muestra que se deduce que contiene una bacteria productora de la enzima sintetizadora de pared celular proteína de unión a penicilina 2' o a una solución de

5 muestra que se deduce que contiene proteína de unión a penicilina 2' liberada de la pared celular mediante pretratamiento de muestra, en el que el anión que tiene una alta tendencia a la ionización se selecciona del grupo consistente en un ión cloruro, un ión bromuro y un ión yoduro, y en el que el catión que tiene una alta tendencia a la ionización se selecciona del grupo consistente en un ión de potasio, un ión de calcio, un ión de sodio y un ión de magnesio.

9. El kit según la reivindicación 8, que comprende adicionalmente una solución alcalina para el tratamiento alcalino de una muestra con base y un tampón para neutralización.

Fig. 1

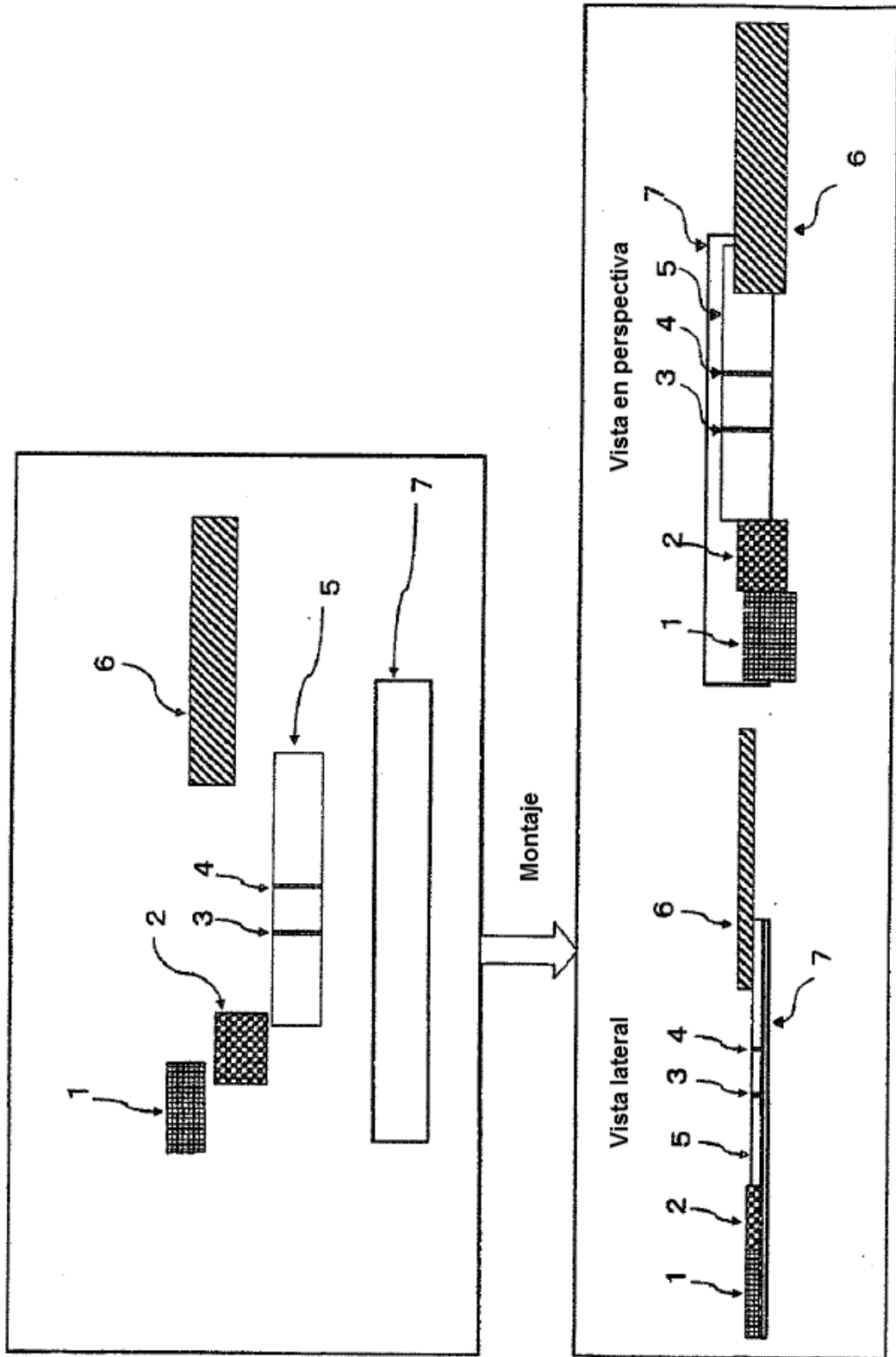


Fig. 2

