

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 478**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
B03C 1/00 (2006.01)
B03C 1/06 (2006.01)
B03C 1/01 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 35/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008 E 08877043 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2336349**

54 Título: **Procedimiento rápido de detección de microorganismos con partículas magnéticas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.04.2016

73 Titular/es:

BIÓTICA, BIOQUÍMICA ANALÍTICA, S.L. (100.0%)
Pasaje José Pascual Goterris Albiol 2 Entresuelo 2
12540 Vila Real (Castellón), ES

72 Inventor/es:

RODRÍGUEZ ALBALAT, GUILLERMO;
JIMÉNEZ BONO, MARÍA LUISA y
CANÓS MARTÍ, DANIEL

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Mónica

ES 2 566 478 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).

Procedimiento rápido de detección de microorganismos con partículas magnéticas

DESCRIPCIÓN

5

Campo técnico de la invención

10 La presente invención se refiere a procedimientos para la detección, semicuantificación y cuantificación rápida de microorganismos vivos en soluciones o suspensiones utilizando partículas inmunomagnéticas, sin necesidad de un pre-enriquecimiento por cultivo del microorganismo. La invención también se refiere a kits para llevar a cabo dichos procedimientos y a la cuantificación de los microorganismos detectados mediante un equipo biosensor automatizado.

15 Antecedentes de la invención

La contaminación microbiana tiene graves consecuencias para la salud humana y ambiental, no solo por su efecto sobre la prevención y el cuidado de la salud, sino también por su impacto económico de largo alcance (Hutton G, Bartram J, "Global costs of attaining the Millennium Development Goal for water supply and sanitation", Bulletin of the World Health Organization, 86(1):13-9, 2008). Las bacterias, los virus, las levaduras y los protozoos son agentes causales de un extraordinario número de enfermedades.

25 Estos microorganismos infecciosos son agentes biológicos que llegan a sus hospedadores a través de soportes que sirven de vehículo, se establecen en el cuerpo de su hospedador y causan daños. De acuerdo con la presente invención, un microorganismo es un organismo microscópico procariótico o eucariótico, no incluyendo los virus.

Las bacterias incluyen fundamentalmente las conocidas como patógenas, tales como por ejemplo, especies de *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Legionella*, *Enterobacter*, etc.

30 Las bacterias pueden propagarse a los vertebrados por distintos métodos, concretamente a través de los alimentos (por ejemplo, *Salmonella*), bebidas contaminadas (por ejemplo, *Escherichia coli*) o en gotitas transmisibles por el aire (por ejemplo, *Legionella*). Por lo tanto, debe comprobarse de forma regular su ausencia en sitios tales como torres de refrigeración, conducciones de agua en hospitales y hoteles, edificios públicos como escuelas, piscinas, gimnasios, balnearios, spas, y similares. El procedimiento de la presente invención se aplicará generalmente a bacterias patógenas.

40 Estos soportes pueden contener al microorganismo infeccioso, que causa el daño o la enfermedad, durante un tiempo suficiente como para permitir incluso la proliferación del mismo, de modo que en solo unas horas o días pueden alcanzar una concentración infectiva, por encima de la cuál es altamente probable que lleguen al hospedador y causen daños.

45 Es obvio que resulta necesaria la detección de la presencia y concentración del agente biológico causal en estos soportes, que le sirven de vehículo para llegar al hospedador, de cara a establecer una correcta prevención de los riesgos ambientales y sanitarios asociados. En particular, la obtención rápida de resultados y simplicidad del procedimiento para determinar su presencia y concentración, hace posible dos cuestiones fundamentales para definir una estrategia eficiente de prevención y control: 1) incrementar la frecuencia de análisis con un coste bajo y asequible, que facilite su aplicación industrial; y 2) realizar el análisis *in situ* en tiempo corto, para evitar concentraciones infectivas sostenidas en el tiempo y minimizar la probabilidad de la enfermedad, permitiendo aplicar de forma oportuna medidas correctoras. Esto posibilita la integración del análisis en las operaciones rutinarias de vigilancia y control de los entornos de riesgo.

50 Los métodos tradicionales para la detección y enumeración de microorganismos son lentos y complejos por lo que requieren de personal cualificado para ejecutar varias etapas de manipulación (Noble RT, Weisberg SB. "A review of technologies for rapid detection of bacteria in recreational waters". Journal of Water and Health, 3(4):381-92, 2005 ; Gracias KS., McKillip JL., "A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food", Canadian Journal of Microbiology, 50(11):883-90, 2004; Rompré A., Servais P., Baudarts J., de-Roubin MR., Laurent P., "Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches", Journal of Microbiological Methods, 49(1):31-54, 2002). El método estándar comprende el aislamiento y recuento de las colonias de la bacteria crecidas en determinadas condiciones de cultivo. También presenta serias limitaciones para realizar una correcta prevención del riesgo asociado al microorganismo, entre otras, las siguientes: 1) la concentración del microorganismo que se quiere determinar en las muestras puede ser baja, y además puede ir acompañado de otros microorganismos distintos (microbiota). En consecuencia puede ser necesario separar la microbiota antes de inocular los medios de cultivo. De lo contrario, dicha microbiota puede competir favorablemente en el medio de cultivo, y proliferar hasta enmascarar o impedir el crecimiento del microorganismo que se quiere

determinar; y 2) generalmente el tiempo requerido desde la toma de muestra hasta la obtención del recuento, es superior al tiempo necesario para que el microorganismo se duplique, en varias horas, y en algunos casos incluso en varios días o semanas. Este tiempo es incluso significativamente mayor que el tiempo que el microorganismo puede requerir para alcanzar una concentración infectiva. Por lo tanto, es necesario poder detectar el microorganismo en la muestra en un tiempo breve, por ejemplo aproximadamente en 1 hora.

Estas limitaciones han impulsado el desarrollo de otros métodos alternativos. En particular, el uso de biomoléculas de reconocimiento, tales como anticuerpos, antígenos y ácidos nucleicos, inmovilizados sobre una amplia diversidad de soportes (fase sólida), tiene un gran interés para el desarrollo de inmunoensayos en el campo ambiental, alimentario, biomédico, industrial y de la química analítica.

Se han desarrollado algunos métodos para sustituir a las técnicas tradicionales, como por ejemplo, inmunoensayos y técnicas PCR (por sus siglas en inglés, reacción en cadena de la polimerasa, *polymerase chain reaction*), los cuales además de ser algo más rápidos, son bastante específicos y sensibles.

Recientemente se han desarrollado inmunoensayos, basados en la reacción antígeno-anticuerpo, que se utilizan comúnmente para detectar microorganismos patógenos, productores de enfermedades (Meer RR, Park DL., "Immunochemical detection methods for *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in foods", *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 142:1-12, 1995). Sin embargo, estos métodos presentan serios inconvenientes. Entre dichos inconvenientes destacan los siguientes:

- 1) Un resultado negativo no descarta la presencia del microorganismo en la muestra analizada, ya que el microorganismo podría encontrarse en concentraciones inferiores al límite de detección del método. Por eso, en los inmunoensayos, incluyendo los de tipo de tipo ELISA (por sus siglas en inglés, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, *enzyme-linked immunosorbent assay*) se requiere de una concentración mínima de 10^5 - 10^6 células para la detección del microorganismo, en un volumen de ensayo limitado generalmente de entre 0,1 y 1,0 ml. Este límite está muy condicionado porque estos métodos no permiten el uso de grandes volúmenes de muestra ya que muchos inmunoensayos disponibles comercialmente requieren de una concentración mínima de células del microorganismo para la detección, lo que hace necesario un pre-enriquecimiento de la muestra y en consecuencia un incremento significativo del tiempo de ensayo, necesario para alcanzar una concentración celular suficiente del microorganismo que se quiere determinar.
- 2) Además, el método no diferencia entre bacterias vivas o muertas, porque también se detecta el antígeno libre, y porque después de la aplicación de tratamientos biocidas se podrían obtener falsos positivos debido a la presencia de bacterias muertas o del antígeno libre.
- 3) El límite de detección del ensayo depende en gran medida de la composición de la muestra, tanto microbiológica como química, porque la presencia de ciertos compuestos químicos o de actividades enzimáticas de otros microorganismos o incluso del propio microorganismo que se quiere analizar, pueden interferir en la detección y cuantificación de éste último.

Otro conjunto de técnicas, las mencionadas técnicas PCR, se basan en la amplificación de un fragmento específico del genoma del microorganismo. Los ácidos nucleicos de una muestra se extraen y purifican, para después amplificarlos enzimáticamente (mediante la enzima polimerasa) por ciclos y revelado mediante electroforesis o marcaje con sondas fluorescentes. Las limitaciones principales de éstos métodos son la variabilidad elevada que muestran los resultados dependiendo de la matriz analizada (Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, André J, Festoc G, Delabre K, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. "Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems", *Applied Environmental Microbiology*, 73(5):1452-6, 2007; Joly P, Falconnet PA, André J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, Maurin M, Etienne J, Jarraud S., "Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation", *Applied Environmental Microbiology*, 72(4):2801-8, 2006), y del procedimiento de preparación de la muestra antes de la extracción de los ácidos nucleicos, y por otro lado, de la gran variedad de inhibidores de la enzima polimerasa, que pueden encontrarse presentes en las muestras.

Un documento de patente representativo de análisis de bacterias en muestras líquidas mediante PCR es el documento WO 01/40505 A1. Dicho documento describe un procedimiento de análisis para la presencia de *Legionella* con una etapa de inmunocaptura y menciona que la ventaja principal de detectar la *Legionella* por PCR es que necesita de 24 a 48 h si el análisis se lleva a cabo por este método, comparativamente al método tradicional de cultivo que necesita de 10 a 15 días para obtener los resultados. En dicho documento, las bacterias pueden ser capturadas mediante soportes activados con anticuerpos, y se menciona la posibilidad de utilizar bolas magnéticas, para luego romper las células y extraer el DNA, con el objetivo de realizar una PCR. Es un método por tanto que requiere la rotura de la integridad del microorganismo y que está sujeta a los inconvenientes conocidos de la PCR. La invención también se refiere a un kit para llevar a cabo el método.

Actualmente no existe un método universalmente aceptado para la preparación de la muestra, que permita obtener resultados reproducibles en todo tipo de muestras mediante la técnica de PCR, por lo que resulta necesario seguir desarrollando nuevos métodos de eliminación de inhibidores de la reacción y que simultáneamente permitan una

recuperación eficiente del microorganismo.

Otra opción es la inmunocaptura del microorganismo que se quiere determinar, mediante el uso de partículas o esferas paramagnéticas, recubiertas con anticuerpos dirigidos contra antígenos del microorganismo en cuestión. Estas partículas inmunomagnéticas son mezcladas con la muestra, forman inmunocomplejos con el microorganismo específico, y permiten separar y concentrar los microorganismos capturados, mediante la aplicación de un campo magnético, eliminando otros componentes de la muestra que puedan interferir con la determinación.

Por ejemplo, se ha descrito el uso de una separación inmunomagnética mediante partículas o esferas superparamagnéticas recubiertas con anticuerpos dirigidos contra antígenos del microorganismo de interés, en combinación con la técnica de PCR en tiempo real (Yáñez MA, Carrasco-Serrano C, Barberá VM, Catalán V. "Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene", Applied Environmental Microbiology, 71(7):3433-41, 2005), pero la tasa de recuperación del microorganismo y la reproducibilidad de su captura disminuyen con el aumento de la complejidad del agua analizada.

Las técnicas para incrementar la sensibilidad de los ensayos de inmunosorción se han centrado en aumentar la eficiencia de la transducción de la señal, mediante el uso de moléculas de lectura más eficientes y de mejores detectores (L.J. Kricka, "Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays", Clinical Chemistry, Vol 40, 347-357, 1994). Estas técnicas han supuesto la reducción del tiempo de pre-enriquecimiento de la muestra, aunque no por debajo de las 8 horas, y el límite de detección se sitúa en 10^6 ufc/l. Por ejemplo, para incrementar la sensibilidad del método de inmunocaptura de los microorganismos se aplican varios métodos, como por ejemplo, el documento US 2005/0202518 A1 que aplica microesferas inmunomagnéticas en la etapa de inmunocaptura, pero después de una etapa de pre-enriquecimiento del cultivo durante 8-15 horas.

El documento de patente US 2006/0246535 A1 describe la detección de microorganismos en solución o dispersión, sin pre-enriquecimiento, utilizando microesferas de látex recubiertas de anticuerpos, detectando posteriormente el microorganismo por medio de la medición de la aglutinación.

En el documento ES 2 237 272 A1 se describe un procedimiento para detectar y cuantificar anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila* en muestras serológicas, mediante aglutinación-sedimentación de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno de *L. pneumophila*. Asimismo se describe el método de obtención de las partículas de látex sensibilizadas y el tampón de reacción donde se desarrolla la inmunorreacción.

En algunas patentes se pretende incrementar la sensibilidad de la detección de microorganismos mediante el uso de nanopartículas magnéticas frente a micropartículas magnéticas ($1 \mu\text{m} = 1000 \text{ nm}$). Por ejemplo, la patente US 2006/292555 A1 indica que "hasta ahora, no hay ensayos satisfactorios para detectar concentraciones de bacterias del orden de 100 células/ml, a no ser que comprendan una etapa de pre-enriquecimiento mediante un proceso de cultivo". Explícitamente, la mencionada patente expresa que la sensibilidad conseguida, del orden de 10-100 bacterias/ml, no puede lograrse mediante micropartículas, entendiéndose como tales aquellas cuyo diámetro está en el orden de un micrómetro, no de un nanómetro. Así, dicho documento de patente describe un método para detectar patógenos, que comprende la utilización de nanopartículas magnéticas formadas por un antibiótico, la vancomicina unido a la superficie de nanopartículas de FePt (hierro-platino).

Existen varios documentos cuyo método comprende la atracción magnética de las partículas sobre un soporte sólido. Por ejemplo, los documentos de patente US 5.834.197 y 6.159.689, ambos de los mismos autores, describen métodos de captura y marcado de una especie, que consisten en la atracción de partículas que tienen afinidad por la especie buscada. El método comprende la atracción magnética de dichas partículas sobre un soporte sólido por fuerzas magnéticas, y estando inmovilizadas, obligando así a circular la muestra y hacerla pasar por el soporte. Por un lado es evidente que el número de colisiones favorables para una interacción antígeno-anticuerpo será menor en tanto que las partículas están fijas en un soporte, y parte de la superficie recubierta con anticuerpos no está accesible, y por otro lado, el área expuesta es siempre la misma y solo una fracción del área está realmente disponible, de modo que el impedimento estérico debido a las bacterias inicialmente capturadas limita muy pronto la eficiencia de nuevas colisiones. Esta pérdida de área eficaz no se debe solo al contacto permanente con el soporte, sino también a la agregación de las partículas, favorecida cuando son retenidas sobre el soporte y se encuentran muy próximas entre sí, lo que incrementa aún más esa merma de eficiencia. Además, la misma muestra es recirculada repetidas veces por el soporte con las partículas retenidas; por lo que no hay posibilidad de refrescar la muestra por cargas, sino que se agota una única carga de muestra por recirculación.

El documento WO 02/101354 A2, que se refiere a kits y métodos para la detección de microorganismos en una muestra, también describe un método que comprende adherir anticuerpos específicos a un marcador de los microorganismos, de captura a un soporte sólido; seguido por la adición de unos segundos anticuerpos que pueden estar conjugados a una molécula que denota la presencia de los microorganismos, preferiblemente por medio de luz que se puede detectar.

El documento ES 2 208 121 A1 también se refiere a un método para la identificación y cuantificación de analitos en el que los anticuerpos y los antígenos están inmovilizados, pero en lugar de sobre un soporte sólido como en los documentos WO 02/101354 A2, US 5.834.197 y 6.159.689, sobre partículas magnéticas de sílice que se utilizan como biosensores. Las partículas magnéticas de la invención son nanopartículas de óxido de hierro obtenidas por el método de Massart, con un tamaño de 5 a 30 nm, recubiertas por una capa de sílice de 30 a 100 nm de espesor.

El resumen del documento WO 2006/123781 A1 también se refiere a la utilización de partículas magnéticas de sílice en métodos para recuperar un microorganismo a partir de una muestra, para lo cual la muestra se pone en contacto con las partículas que lo absorben. Las partículas se caracterizan porque tienen un diámetro de 6 μm o menor y su superficie específica es de 50 m^2/g o menor.

El documento US 2006/0211061 A1 se refiere a métodos para la detección rápida de microorganismos patógenos en un fluido por medio de inmunoensayos. El método consiste en unir una micropartícula magnética con un primer epítipo del microorganismo en un fluido por medio de un anticuerpo; utilizar un campo magnético para separar la micropartícula magnética unida al microorganismo; uniendo una molécula de glucosa a través de un segundo anticuerpo al segundo epítipo del microorganismo en cuestión; y detectar la glucosa en la muestra para determinar la presencia y la concentración del microorganismo. Las micropartículas comprenden microesferas de un material superparamagnético recubierto con un polímero o proteína, por ejemplo, albúmina o avidina.

Sin embargo estos métodos presentan inconvenientes que dificultan su aplicación industrial. Estos inconvenientes incluyen, entre otros, los siguientes:

1) La inmovilización de los anticuerpos sobre la superficie de las partículas magnéticas requiere de la presencia en dicha superficie de grupos reactivos, por ejemplo de grupos hidroxilo, amino o carboxílicos. Una vez unidos los anticuerpos a la superficie mediante dichos grupos reactivos, pueden quedar grupos libres que representan sitios activos a los que puede unirse también otros compuestos presentes en la muestra que puedan interferir la interacción antígeno-anticuerpo, o bien en la composición de los reactivos de revelado, o incluso los propios anticuerpos inmovilizados cuya orientación al medio exterior queda alterada, haciendo menos probable la interacción con el antígeno y en consecuencia la captura y recuperación del microorganismo.

2) Las partículas inmunomagnéticas colisionan entre sí de modo que pueden interaccionar mediante enlaces débiles que pueden favorecer la formación de agregados antes de la mezcla con la muestra, o bien después de la mezcla con la muestra, efecto que depende de la concentración de la partícula y del tiempo de contacto. Esto limita la posibilidad de reducir el límite de detección incrementando la cantidad de partícula, y limita la vida útil del método basado en el uso de las partículas.

3) Las partículas magnéticas mezcladas con la muestra compleja, pueden interaccionar con algunos componentes que puede favorecer la formación de agregados, de forma que la interacción de la partícula con el microorganismo es menos probable, y de forma que la eficiencia de la retención magnética es menor; en consecuencia hace menos probable la captura y recuperación del microorganismo de interés y su eficiencia disminuye.

4) No es posible la manipulación y recuperación cuantitativa de las partículas inmunomagnéticas, debido fundamentalmente al inconveniente anterior, y principalmente en volúmenes grandes de muestra; en consecuencia no es posible reducir el límite de detección mediante el uso de volúmenes grandes de muestra porque se producen pérdidas variables de partículas inmunomagnéticas y de complejos entre las partículas inmunomagnéticas y los microorganismos.

5) Algunos componentes presentes en la muestra compleja o en las disoluciones que entran en contacto con las partículas en alguna o varias de las etapas de la separación, pueden alterar su recubrimiento favoreciendo la desorción de la molécula de bloqueo, quedando expuestos grupos reactivos en los que se pueden adsorber otras moléculas que perjudiquen la interacción del microorganismo con el anticuerpo inmovilizado (anticuerpo de captura), o dicho anticuerpo inmovilizado, o el anticuerpo de lectura.

6) La composición y concentración de distintos antígenos que los microorganismos exponen en su superficie puede cambiar en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Albers U, Tieden A, Spirig T, Al Alam D, Goyert SM, Gangloff SC, Hilbi H., "Expression of *Legionella pneumophila* paralogous lipid A biosynthesis genes under different growth conditions", *Microbiology*, 153(Pt 11):3817-29, 2007), y en consecuencia la sensibilidad y reproducibilidad de la determinación del microorganismo puede depender del origen de la muestra y sus condiciones ambientales.

7) Los microorganismos de interés que son capturados mediante las partículas inmunomagnéticas, pueden presentar enzimas endógenas que interfieren con la lectura de los complejos que forman con dichas partículas, y que no pueden ser separados y eliminados sin alterar la integridad estructural del microorganismo capturado. Estas interferencias son dependientes de la concentración del microorganismo capturado, de forma que para concentraciones elevadas del microorganismo, dichas interferencias pueden causar una subestimación de la cantidad del microorganismo en una determinación cuantitativa o semicuantitativa, o causar un falso negativo en una determinación cualitativa. En particular, los microorganismos no anaerobios estrictos (aerobios, anaerobios facultativos, aerotolerantes y microaerófilos), tales como, entre otros, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Legionella*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Campylobacter* o *Listeria*, presentan una enzima endógena, la catalasa, que compite por el peróxido de hidrógeno adicionado como sustrato de la enzima peroxidasa, habitualmente conjugada al anticuerpo de lectura.

En los últimos años existe una demanda creciente de información relacionada con la determinación de analitos de variada naturaleza en muestras complejas, y en áreas cada vez más diversas, de una forma rápida, simple y sensible. Para salvar las dificultades de los métodos convencionales que impiden satisfacer esta demanda, un gran esfuerzo en el campo de la instrumentación analítica ha sido dirigido hacia la obtención de dispositivos cuya utilización no requiera de la supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea menor, capaces de proporcionar una información analítica de forma rápida, selectiva, sensible, fiable y descentralizada.

Esta demanda ha favorecido el desarrollo de biosensores como alternativas de análisis a la instrumentación analítica convencional, con el objetivo de separar el analito de la matriz compleja en la que se encuentra y medir su presencia o su concentración.

La preparación de biosensores basados en la utilización de partículas magnéticas ha abierto nuevas perspectivas de aplicaciones a cualquier análisis con soportes sólidos, especialmente en sistemas automáticos.

Existen varios documentos de patente que se refieren a aparatos que funcionan como biosensores y que sirven para la detección de microorganismos. Así, el documento ES 2 220 227 A1 se refiere a un método y aparato para la detección de sustancias o analitos a partir del análisis de una o varias muestras. La invención se refiere a un aparato robotizado susceptible de manejo por control remoto y a un método que permite el análisis de múltiples muestras naturales. Dicha invención se beneficia de la tecnología de microarrays de DNA y proteínas. El aparato comprende una serie de módulos operativos, en los cuales se manipulan, tratan y analizan las muestras, y una serie de módulos de control, que supervisan el funcionamiento de dichos módulos operativos. El método para analizar la muestra comprende hacer reaccionar dicha muestra con un biosensor, lavar el exceso de muestra no reaccionada y detectar la muestra retenida en el biosensor. El documento WO 93/25909 A1 se refiere a un aparato para la detección de la presencia de analitos de interés en una muestra, particularmente biosensores, así como al método para detectar la presencia de un analito, y el documento US 7.220.596 B2 se refiere a la detección de antígenos que pueden capturarse y detectarse a partir de muestras como por ejemplo alimentos, en aproximadamente 30 minutos utilizando un aparato y método que incluye el paso de la muestra a través de un módulo que contiene anticuerpos unidos a partículas. El flujo de la muestra a través de las partículas modificadas es de 0,2 a 1,2 l/minuto. Los antígenos son capturados así por los anticuerpos y entonces se lleva a cabo la detección de los anticuerpos por fluorescencia, quimioluminiscencia, o técnicas de espectrometría.

Por lo tanto, todavía es necesario un método que se pueda llevar a cabo *in situ*, por ejemplo, por medio de un kit, que permita detectar y semicuantificar un microorganismo patógeno determinado en un tiempo mínimo, como por ejemplo de 1 hora, para poder tomar inmediatamente las medidas necesarias.

Por lo tanto, en la presente invención se proponen kits y procedimientos simples para la determinación rápida y sensible de la presencia de microorganismos en un amplio rango de muestras de origen ambiental o alimentario, así como en fluidos biológicos, mediante partículas inmunomagnéticas en suspensión, que salva los inconvenientes anteriores, permitiendo obtener el resultado del análisis *in situ*, en un tiempo inferior o igual a una hora, sin limitación de volumen de la muestra, y para concentraciones del microorganismo de interés del orden de 1 célula por mililitro, y hace posible su aplicación industrial.

Objeto de la invención

En una realización, la presente invención proporciona un método para detectar y semicuantificar *in situ* microorganismos vivos en una muestra. En otra realización, la presente invención proporciona un método para cuantificar microorganismos vivos a partir de una muestra en laboratorio. Y en otra realización, la presente invención proporciona un método para detectar y cuantificar microorganismos vivos mediante un equipo biosensor automatizado.

Se ha encontrado sorprendentemente que es posible detectar la presencia o ausencia de una bacteria patógena, como por ejemplo, *Legionella*, *Salmonella* o *E. coli*, en una muestra biológica empleando métodos que utilizan un biosensor altamente específico y de gran sensibilidad. Son unas partículas paramagnéticas que poseen en su superficie anticuerpos específicos del microorganismo a detectar y un agente bloqueante que previene la unión de moléculas contaminantes presentes en la muestra biológica.

El procedimiento de la presente invención reduce las interacciones débiles que pueden darse entre las partículas gracias a que dichas partículas están protegidas en todo momento del análisis, mediante el bloqueo de su superficie constante, obtenido al desplazar el equilibrio de adsorción-desorción de una molécula de bloqueo hacia la molécula adsorbida. Dicho bloqueo permite una inertización o recubrimiento dinámico, que oculta los grupos reactivos de la superficie de la partícula, e impide tales interacciones, de modo que la agregación de partículas se reduce, así como su adherencia a las superficies contenedoras. Al mismo tiempo esto es posible gracias a que la concentración del agente de bloqueo, que determina la cantidad de molécula de bloqueo en disposición de ser adsorbida, y la de los tampones, que determina la fuerza iónica para permitir la aproximación de la molécula de bloqueo a la superficie de

la partícula, permiten mantener en todo momento la cantidad necesaria de moléculas de bloqueo adsorbidas y una fuerza iónica adecuada para que dichas moléculas puedan ser rápidamente reemplazadas por otras próximas a la superficie del soporte, y para que las moléculas de lectura se aproximen al microorganismo capturado; y además, porque se utilizan agentes quelantes y tensioactivos combinados para reducir las interferencias de la muestra debidas a la formación de complejos insolubles que perjudican la retención magnética de las partículas, y un inhibidor de las actividades microbianas potencialmente interferentes que pueden competir con el marcador por los sustratos que dicha molécula utiliza para el revelado de la señal que se mide. Así, todo ello hace posible una recuperación cuantitativa de las partículas que permite manejar volúmenes grandes y mejorar la sensibilidad del método dado que aumenta la cantidad absoluta de células del microorganismo de interés así como la probabilidad de colisión, captura y retención del dicho microorganismo.

La presente invención también se refiere a un kit de detección de la presencia o ausencia de un antígeno producido por una bacteria determinada de la muestra, que contiene las partículas magnéticas unidas a anticuerpos específicos dirigidos contra los correspondientes antígenos de la bacteria determinada, así como moléculas bloqueantes, un segundo anticuerpo marcado y todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento.

Además, la presente invención también se refiere al uso de un equipo biosensor automatizado para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención, para la detección y/o semicuantificación y/o cuantificación de microorganismos vivos en el laboratorio a partir de una muestra.

Según la presente invención por microorganismo se entiende cualquier organismo microscópico procariótico (incluyendo bacterias) o eucariótico (incluyendo protozoos, algas, levaduras y hongos), no incluyendo los virus.

Las bacterias fundamentalmente incluyen las conocidas como patógenas, como por ejemplo, especies de *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Legionella*, *Enterobacter*, etc.

Por soporte se entiende un sólido formado por un material polimérico que tiene, en su superficie, un gran número de grupos químicos necesarios para fijar moléculas de interés.

Por cuantificar se entiende determinar de forma exacta la concentración o cantidad del microorganismo de interés en la muestra.

Por semicuantificar se entiende determinar de forma aproximada la concentración del microorganismo de interés en la muestra.

Por detectar se entiende determinar la presencia-ausencia del microorganismo de interés en la muestra.

En la presente invención "muestra" se considera la que es sospechosa de contener al microorganismo. La muestra generalmente será de origen ambiental o alimentario, y en determinados casos será de fluidos biológicos, como por ejemplo, esputos, secreciones respiratorias o tejido pulmonar.

Por anticuerpo se entiende una molécula capaz de reconocer y unirse específicamente a determinadas moléculas expuestas en el microorganismo de interés, denominadas antígenos. Dichos anticuerpos pueden ser de captura. Dichos anticuerpos pueden ser de captura o un segundo anticuerpo dirigido contra un sitio diferente en el microorganismo al que ya está unido el anticuerpo de captura, y puede ser monoclonal o policlonal.

Por anticuerpo monoclonal se entiende un anticuerpo homogéneo derivado de un solo clon de hibridoma, por lo que todos portan idénticos sitios de fijación del antígeno.

Por anticuerpo policlonal se entiende un conjunto heterogéneo de anticuerpos dirigidos contra diferentes sitios del mismo antígeno.

Por un segundo anticuerpo dirigido específicamente contra un sitio diferente en el microorganismo al que ya está unido el anticuerpo de captura se entiende: un anticuerpo que interactúa con su antígeno correspondiente expuesto en la superficie de la célula del microorganismo, conjugado con una molécula capaz de producir una señal detectable, por ejemplo, una enzima que cataliza una reacción que produce un cambio de color o absorbancia, o por ejemplo, una molécula capaz de producir una emisión fluorescente.

Por anticuerpo de captura se entiende: un anticuerpo que está inmovilizado sobre la superficie del soporte e interacciona con su correspondiente antígeno expuesto en la superficie de la célula del microorganismo para formar un complejo soporte-microorganismo. Sustrato oxidante se refiere al compuesto químico que gana electrones en una reacción redox.

Sustrato oxidable se refiere al compuesto químico que cede electrones en una reacción redox. También denominado

sustrato reductor.

Acido fuerte es aquel ácido que en disolución acuosa se disocia completamente en sus iones constituyentes proporcionando iones de hidrógeno al medio (H^+).

5 Base fuerte se refiere a la base que en disolución acuosa se disocia completamente en sus iones constituyentes, proporcionando iones hidroxilo (OH^-)

10 Por sal débil se entiende aquella sal que en disolución acuosa se disocia en sus iones constituyentes solo en una pequeña parte, en contraposición a una sal fuerte que se disocia al 100 %.

Agente quelante se refiere al compuesto que forma un complejo soluble con los iones metálicos, denominado quelato.

15 Tensioactivo se refiere al agente que disminuye la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases.

Por agente bacteriostático se entiende aquella sustancia química que inhibe el crecimiento y la reproducción del microorganismo sin matarlo.

20 Agente biocida se refiere a aquella sustancia química que destruye el microorganismo.

Así, un primer objeto de la presente invención está constituido por un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos en una solución o suspensión, que no contiene microorganismos pre-cultivados, que comprende las etapas de:

- 25 a) mezclar la muestra sospechosa de contener el microorganismo con i) una suspensión amortiguadora del pH, que comprende al menos un tipo de partículas paramagnéticas que tienen unido a su superficie un anticuerpo dirigido específicamente contra el microorganismo que se quiere determinar; y ii) seroalbúmina bovina (BSA) en exceso en la superficie de dichas partículas magnéticas no ocupadas por el anticuerpo;
- 30 b) incubar la mezcla durante un tiempo determinado en condiciones adecuadas para formar los complejos microorganismo-partícula magnética;
- c) aplicar un campo magnético para la separación y concentración de los complejos microorganismo-partícula magnética formados; y posterior evacuación del sobrenadante;
- 35 d) resuspender los complejos microorganismo-partícula magnética en una disolución amortiguadora del pH, que comprende al menos un tipo de molécula bloqueante en exceso y un segundo anticuerpo marcado con un marcador (una enzima o un fluoróforo);
- e) incubar la mezcla durante un tiempo determinado para formar los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética;
- 40 f) aplicar un campo magnético para la separación y concentración de los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética formados; y posterior evacuación del sobrenadante;
- g) lavar las partículas para eliminar el exceso del segundo anticuerpo, y evacuación posterior del sobrenadante;
- 45 h) resuspender los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética formados, en un medio líquido que contiene simultáneamente los sustratos necesarios para el marcador enzimático de d), un agente bloqueante a una concentración que permite mantener el equilibrio de adsorción desplazado hacia el agente bloqueante unido, y un inhibidor específico para las enzimas microbianas intrínsecas que compite con dichos sustratos y se selecciona del grupo que consiste en azida de sodio y tiazol a una concentración del 0,01 % en una solución de fosfato y tampón citrato con una concentración de 50 mM, y un sustrato para la enzima marcadora, seleccionado del grupo que consiste en peróxido de hidrógeno y peróxido de urea;
- 50 i) incubar la mezcla durante un tiempo determinado para revelar la señal;
- j) detectar y cuantificar la señal resultante de la formación de los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética formados, relacionando dicha señal con la presencia y cuantificación del microorganismo buscado, caracterizado por que el agente bloqueante usado es seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración de entre el 0,1 – 10 %.

55 En dicho procedimiento:

- la muestra es de origen ambiental, alimentario u obtenida de fluidos biológicos,
- el microorganismo es un organismo microscópico procariótico, preferentemente bacterias y más preferentemente o eucariótico, preferentemente protozoos, algas, levaduras y hongos, bacterias patógenas, como especies de *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Legionella*, *Enterobacter*, etc., o un organismo eucariótico, preferentemente protozoos, algas, levaduras y hongos
- el segundo anticuerpo dirigido específicamente contra el microorganismo unido a un sitio diferente al que ya está unido el anticuerpo de captura y/o el anticuerpo de captura para el microorganismo de interés es monoclonal o policlonal.
- 65 - las partículas magnéticas son esféricas y el rango del diámetro es de 0,5 μm a 2 μm , preferiblemente de 0,7 μm

a 1,5 μm , y más preferiblemente de 0,8 μm a 1,0 μm , estando dichas partículas funcionalizadas químicamente especialmente con grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ u $-\text{OH}$;

- durante todas las etapas se mantiene un exceso de concentración de al menos un tipo de molécula bloqueante, de manera que el equilibrio adsorción-desorción se encuentra desplazado hacia la molécula adsorbida, para prevenir la adsorción no específica sobre las partículas magnéticas, evitando falsos positivos y falsos negativos.
- el agente bloqueante es una proteína, preferentemente, seroalbúmina bovina.
- permite el empleo de grandes volúmenes y/o cargas sucesivas de la misma muestra sobre los mismos soportes constantemente protegidos frente adsorciones no deseables, aumentando la sensibilidad del método.
- presenta una sensibilidad de detección de 1 célula/ml
- el resultado se obtiene en un tiempo inferior o igual a una hora.

Otro objeto de la invención se refiere al procedimiento en que el tiempo en la etapa de inmunocaptura se ve incrementado aumentando la sensibilidad del método gracias a que la protección sostenida de la superficie de la partícula impide el incremento de la adsorción no específica durante todo el análisis.

Otro objeto de invención se refiere al kit para llevar a cabo el procedimiento anteriormente descrito, caracterizado porque comprende: un aparato portátil reutilizable de uso manual para el análisis *in situ* y un conjunto de composiciones o medios reactivos para la realización del análisis, todo ello dispuesto en un contenedor que incorpora una placa refrigerante. Dicho kit comprende un soporte con al menos dos cubetas y un imán, y una carta de colores para una correcta interpretación de los resultados, siendo las composiciones o medios reactivos:

a) composición para la captura del microorganismo de interés, que comprende una suspensión de partículas inmunomagnéticas (con el anticuerpo de captura inmovilizado en la superficie de las mismas mediante unión covalente, y un agente de bloqueo unido a la superficie no ocupada por el anticuerpo, mediante unión no covalente), en un medio líquido que contiene en disolución i) el mismo agente de bloqueo, ii) un agente quelante, iii) un agente tensioactivo, iv) un agente biocida, y v) un agente bacteriostático, y que presenta fuerza iónica elevada, correspondiente a una disolución de un tampón fosfato de concentración entre 90 y 500 mM, preferentemente entre 100 y 200 mM, y más preferentemente 150 mM.

b) composición de marcaje del microorganismo de interés, que comprende un segundo anticuerpo dirigido específicamente contra el microorganismo a un sitio diferente al que ya está unido el anticuerpo de captura, conjugado con un marcador, una enzima o una sustancia fluorescente, en una disolución que contiene i) un agente de bloqueo y ii) un agente inhibidor de la actividad de enzimas presentes en el microorganismo que puedan competir con el marcador, y que presenta fuerza iónica media correspondiente a una disolución de un tampón fosfato de concentración entre 30 y 90 mM, preferentemente tampón fosfato citrato 50 mM y pH 6,0.

c) un sustrato oxidable necesario para el revelado de la reacción de lectura, en una disolución que contiene una sal débil de fosfato monosódico para reducir la autooxidación de dicho sustrato.

d) un sustrato oxidante, necesario para el revelado de la reacción de lectura, en una disolución de un tampón fosfato-citrato, preferentemente de pH 6,0 y concentración 50 mM.

e) una composición de parada para la reacción de lectura, que comprende un ácido fuerte o una base fuerte.

f) una composición para el lavado de las partículas inmunomagnéticas que comprende un agente de bloqueo, un agente tensioactivo y un agente bacteriostático, con una fuerza iónica baja correspondiente a una disolución de un tampón fosfato de concentración entre 5 y 30 mM, preferentemente fosfato de sodio a pH 7,0 y concentración entre 20 y 30 mM, preferiblemente 25 mM.

En dicho kit

- el agente de bloqueo es seroalbúmina a una concentración del 0,1 – 10 %, la competición de la actividad enzimática microbiana con el marcador se elimina bien utilizando un inhibidor específico para dicha actividad, tal como azida sódica o triazol, preferentemente triazol, o bien utilizando como sustrato oxidante para la enzima de lectura, preferentemente peroxidasa, un peróxido sustituido, preferentemente peróxido de urea, que la actividad enzimática microbiana no reconoce.
- el sustrato oxidante se selecciona entre peróxido de hidrógeno y peróxido de urea, preferentemente peróxido de urea al 0,05%
- el sustrato oxidable se selecciona entre el ácido 5-aminosalicílico, ortofenilendiamina, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), preferentemente ácido 5-aminosalicílico al 0,1 %
- el ácido fuerte se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido sulfúrico, preferentemente ácido clorhídrico 5M y ácido sulfúrico 1M.
- la base fuerte se selecciona entre hidróxido de potasio e hidróxido de sodio, preferentemente hidróxido de sodio 3M.
- la sal débil es fosfato dipotásico y fosfato disódico, preferentemente fosfato disódico 0,1 M.
- el agente quelante se selecciona entre 2,2'-Bipiridilo, dimercaptopropanol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilendioxi-dietilen-dinitrilo-tetraacético, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido nitrilotriacético (NTA), orto-fenantrolina, ácido salicílico y trietanolamina (TEA), preferiblemente EDTA.
- el tensioactivo se selecciona entre detergentes no iónicos, preferentemente alquil fenoles polietoxilados,

alcoholes grasos polietoxilados, ácidos grasos polietoxilados, alcanolaminas o condensados, y más preferentemente el monolaurato de sorbitán (Tween 20).

- el agente bacteriostático se selecciona entre p-nitrofenil-di-cloroacetamido propanodiol (cloranfenicol), sulfanilamida, 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)pirimidina (trimetoprim), preferiblemente sal sódica del 2-(etilmercuriomercurio) benzoico (timerosal).
- el agente biocida se selecciona entre estreptomycin, neomicina, gentamicina, kanamicina, y azida sódica, preferiblemente azida sódica.

Otro objeto de invención lo constituye el kit anteriormente descrito caracterizado porque:

a) en la composición para la captura del microorganismo de interés, en la suspensión, las partículas inmunomagnéticas son esféricas y de un diámetro medio entre 0,8 y 1,1 μm , el anticuerpo de captura es un anticuerpo policlonal o monoclonal anti-*Legionella*, unido covalentemente a la superficie de las partículas, el agente de bloqueo es seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración del 10%, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,1 %, el agente tensioactivo es monolaurato de sorbitán al 1 %, el agente biocida es azida sódica a una concentración del 0,1%, y el agente bacteriostático es timerosal a una concentración del 0,01%, todo ello en una disolución de tampón fosfato de concentración 150 mM a pH 7,0. Dicha composición se añade a la muestra a una proporción 1/10.

b) en la composición de marcaje del microorganismo de interés, el segundo anticuerpo dirigido específicamente contra el microorganismo a un sitio diferente al que ya está unido el anticuerpo de captura es un anticuerpo anti-*Legionella* conjugado con peroxidasa, siendo i) el agente de bloqueo seroalbúmina bovina (BSA) al 0,1 % y ii) el agente inhibidor de la actividad de enzimas presentes en el microorganismo que puedan competir en la molécula de lectura triazol al 0,01 %, en una disolución tampón de fosfato y citrato de concentración 50 mM a pH 6,0, en la solución que los contiene.

c) el sustrato oxidable necesario para el revelado de la reacción de lectura es ácido 5-aminosalicílico al 0,1 %, y una sal débil de fosfato disódico a una concentración de 0,1 M, a pH entre 7,5 y 8,0, para reducir la autooxidación de dicho sustrato

d) el sustrato oxidante, necesario para el revelado de la reacción de lectura, es peróxido de hidrógeno o peróxido de urea, preferentemente peróxido de urea al 0,05 %, en una disolución de un tampón fosfato-citrato de concentración 50 mM a pH 6,0.

e) en la composición de parada de la reacción de lectura, el ácido fuerte es ácido clorhídrico 5 M o ácido sulfúrico 1M y la base fuerte es hidróxido de sodio 3M.

f) en la composición para el lavado de las partículas inmunomagnéticas el agente de bloqueo es seroalbúmina bovina al 0,1, el agente tensioactivo es monolaurato de sorbitán al 0,02 % y el agente bacteriostático es timerosal al 0,01 %, en una disolución de un tampón fosfato con una concentración de 25 mM a pH 7,0.

Otro objeto de invención se refiere al uso del dispositivo de análisis manual reutilizable para la detección o cuantificación de microorganismos en una solución o suspensión siguiendo el procedimiento de la invención, que comprende un soporte (1) que contiene una base (2) y dos planos inclinados laterales (3); un eje móvil (4) que soporta un imán (5) y permite su desplazamiento con respecto al soporte; al menos una sujeción en forma de pinza (7), y al menos una cubeta (6) que descansa sobre la base y está fijada en su posición por la sujeción en forma de pinza (7) según la figura 2.

Otro objeto de invención se refiere al uso de dicho dispositivo manual para la realización de análisis *in situ*.

Otro objeto de invención se refiere al uso de un biosensor automatizado para llevar a cabo el procedimiento anteriormente descrito, de forma automatizada, caracterizado por que consiste en un sistema integrado que comprende

- i) celdas para la reacción de captura y marcaje del microorganismo de interés.
- ii) celdas para la lectura de la absorbancia a la longitud de onda seleccionada o la fluorescencia a la longitud de emisión seleccionada.
- iii) un transductor óptico que en el caso de *Legionella* consiste en un espectrofotómetro o espectrofluorímetro.
- iv) un circuito hidráulico para la manipulación de los diferentes líquidos,
- v) un microprocesador para el control secuencial del análisis y la adquisición de la señal
- vi) un ordenador para el tratamiento de los datos y su comunicación con el microprocesador.
- vii) dispositivos de agitación.
- viii) dispositivos de retención magnética.
- ix) dispositivos termostáticos.

Según se representa en la figura 2. En dicho biosensor cada ciclo de medida comprende el análisis de un blanco y el análisis de una muestra, siendo el valor de absorbancia resultante consecuencia de sustraer la señal del blanco de la señal de la muestra.

Otro objeto de invención se refiere al uso del biosensor anteriormente descrito para la monitorización on-line de la

concentración de un microorganismo en aguas, basado en la utilización de alícuotas desechables de partículas inmunomagnéticas para la captura de dicho microorganismo. En una realización particular, dichos microorganismos son *Legionella* y/o *Salmonella* y/o *Escherichia coli* y/o *Listeria* y/o *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* y/o *Brettanomyces*.

5

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un esquema del dispositivo utilizado en la invención para la realización manual del análisis. Según se indica en la figura, este dispositivo comprende un soporte (1) que contiene una base (2) y dos planos inclinados laterales (3); un eje móvil (4) que soporta un imán (5) y permite su desplazamiento con respecto al soporte; al menos una sujeción en forma de pinza (7), y al menos una cubeta (6) que descansa sobre la base y está fijada en su posición por la sujeción en forma de pinza (7).

10

La figura 2 muestra un esquema del biosensor automatizado utilizado en la invención para la realización automática del análisis. Según se indica en la figura, el biosensor comprende dos compartimientos A y B, estando B contenido en A. El compartimiento A comprende un conjunto de bombas peristálticas y reservorios. Desde un reservorio (22) una sustancia patrón o blanco es transferida a la celda de reacción (11) mediante una bomba peristáltica (1); la muestra es transferida desde el punto de toma de muestra mediante una bomba peristáltica (6) hasta la celda de reacción (11); una composición que contiene la suspensión de partículas inmunomagnéticas es homogenizada mediante un dispositivo de agitación (16) y transferida desde el reservorio correspondiente (15) mediante una bomba peristáltica (3) hasta la celda de reacción (11); un dispositivo de agitación (17), permite homogenizar las mezclas en la celda de reacción (11); un dispositivo de retención magnética (12) permite activar o desactivar un campo magnético sobre la celda de reacción (11); una bomba peristáltica (8) permite evacuar el contenido de la celda de reacción (11) a residuo; una composición que contiene un anticuerpo dirigido contra el microorganismo de interés, denominado anticuerpo de lectura es transferido desde su reservorio (14) hasta la celda de reacción (11), mediante una bomba peristáltica (2); una composición que permite el lavado de las partículas inmunomagnéticas es transferida desde su reservorio (20) hasta la celda de reacción (11) mediante una bomba peristáltica (7); una composición que contiene los sustratos de la enzima peroxidasa (composición de lectura) es transferida desde su reservorio (13) hasta la celda de reacción (11) mediante una bomba peristáltica (4); una composición que contiene un reactivo de parada es transferida desde su reservorio (21) hasta la celda de reacción (11) mediante una bomba peristáltica (5); desde la celda de reacción (11), una bomba peristáltica (18) transfiere su contenido a la celda de lectura (18) mediante una bomba peristáltica (9), haciendo pasar un flujo que es evacuado a residuo; una composición de limpieza del circuito hidráulico es transferida desde su reservorio (19) hasta la celda de reacción (11) mediante una bomba peristáltica (10); la celda de lectura acoplada en un transductor (18) está ubicada fuera del compartimento A, la celda de reacción (11) y el dispositivo de retención magnética (12) se encuentran en el compartimento B, a su vez dentro de A, y todos los demás elementos se encuentran en el compartimento A. El compartimento A está termostatzado a una temperatura de 4-8 °C, y el compartimento B está termostatzado a una temperatura de 24-26 °C. La celda de lectura (18) se encuentra a temperatura ambiente.

15

20

25

30

35

40

45

La figura 3 muestra un registro obtenido en el biosensor automatizado de la señal de un blanco (Sin *Legionella*) y la señal de una muestra (Con *Legionella*). La figura 3 presenta el registro continuo de las lecturas de absorbancia a 550 nm en función del tiempo, correspondiente a un ciclo de medida del biosensor automatizado, que comprende la señal obtenida para un blanco (1) y una muestra que contiene *Legionella pneumophila* (2) a una concentración de 2×10^6 ufc/l, dicha concentración determinada en paralelo por el método de cultivo. El valor resultante de sustraer el valor máximo de absorbancia del blanco del valor máximo de absorbancia de la muestra, se corresponde con la concentración de *Legionella* en la muestra.

50

La figura 4 muestra la correlación entre la absorbancia y la concentración de *Legionella* en agua sanitaria. La figura 4 presenta la correlación obtenida entre la concentración de *Legionella* y la absorbancia medida, expresadas ambas magnitudes en forma logarítmica, en muestras de agua sanitaria. El coeficiente de correlación es elevado ($r = +0,99$), lo que implica que existe un alto grado de concordancia entre la señal medida y el valor de la concentración del microorganismo de interés en la muestra.

55

La figura 5 muestra los resultados obtenidos con el biosensor automatizado para muestras de agua sanitaria y su correspondencia con el método de cultivo. La figura 5 presenta los valores obtenidos para distintas muestras de agua sanitaria mediante el biosensor automatizado, y su paralelismo con los valores correspondientes obtenidos mediante el método de cultivo, en un rango amplio de concentraciones de entre 10^3 y 10^6 ufc/l.

La figura 6 muestra el efecto de la actividad endógena del microorganismo capturado sobre la sensibilidad de su determinación. La figura 6 presenta la variación de la absorbancia a 405 nm en función del tiempo, en la lectura cinética de dos muestras de una misma concentración del microorganismo (*Escherichia coli*), con respecto de un blanco, sin el microorganismo (simbolizado por un triángulo). En una de las muestras (simbolizada por un cuadrado) no se ha inhibido dicha actividad endógena (catalasa) y en la otra muestra (simbolizada por un círculo) dicha actividad ha sido inhibida. La figura demuestra que la sensibilidad del análisis (expresada como la variación de la absorbancia en función del tiempo) aumenta considerablemente cuando la actividad endógena del microorganismo capturado es inhibida (tal y como se realiza en la presente invención), porque compite con la molécula de lectura (peroxidasa) por uno de los sustratos (el peróxido de hidrógeno).

60

65

La figura 7 muestra la determinación semicuantitativa de *Legionella* Spp. Según la tabla de la figura 7, el orden de magnitud de la concentración de *Legionella* en la muestra, expresado como unidades formadoras de colonia

en un litro (ufc/l), puede ser estimado de acuerdo con el color desarrollado por el kit. Los diferentes intervalos de absorbancia se corresponden con diferentes intensidades del color producido, distinguibles visualmente sin necesidad de la lectura óptica.

La figura 8 muestra la determinación cuantitativa de *Legionella*. La tabla de la figura 8 muestra la correspondencia para la concentración de *Legionella* entre los valores obtenidos por cultivo (1), y los valores obtenidos por el procedimiento de la presente invención, tanto en su realización cuantitativa (2), como en su realización cualitativa (3), pudiendo observarse que la presente invención permite una determinación fiable de la presencia o cantidad del microorganismo de interés en la muestra.

La figura 9 muestra la comparación del efecto protector frente a la adsorción no específica de un recubrimiento estático frente a un recubrimiento dinámico de la partícula. La tabla de la figura 9 muestra las lecturas de absorbancia a 405 nm obtenidas al ensayar distintas concentraciones de *Escherichia coli*, para dos tipos distintos de recubrimiento de las partículas inmunomagnéticas. El recubrimiento estático se refiere a la unión covalente de un polímero en la superficie de la partícula (A), y el recubrimiento dinámico se refiere a la unión no covalente de una proteína sostenida en el tiempo mediante el desplazamiento forzado del equilibrio adsorción-desorción de la proteína hacia la molécula adsorbida (B), siendo este último el método llevado a cabo por la presente invención. La discriminación de las concentraciones de *Escherichia coli* en las muestras y la proporcionalidad de las lecturas obtenidas con dicha concentración, son mejores con el recubrimiento dinámico (B) llevado a cabo por la presente invención.

La figura 10 muestra el efecto protector respecto de la adsorción no específica de la presión sostenida en el tiempo del agente bloqueante sobre la superficie de la partícula inmunomagnética. La tabla de la figura 10 presenta la dependencia de la señal correspondiente a la adsorción no específica del anticuerpo de lectura sobre la superficie de las partículas inmunomagnéticas anti *E. coli*, según que el equilibrio de adsorción-desorción del agente bloqueante se mantenga (b) o no (a) desplazado hacia la adsorción. La estrategia de bloqueo permanente basado en mantener la presión de bloqueo durante todo el análisis permite reducir la adsorción no específica significativamente, obteniéndose por lo tanto una mejor sensibilidad porque la diferencia de señal entre el blanco y la muestra es significativamente mayor.

La figura 11 muestra la mejora de la determinación mediante capturas sucesivas. La tabla de la figura 11 presenta una comparación entre dos realizaciones particulares de la presente invención para la medición de la concentración de *Legionella* en la misma muestra de agua. En una realización (A) el análisis comprende un solo evento de captura, y en la otra realización (B) el análisis comprende tres eventos de captura sucesivos. Los resultados demuestran que mediante B es posible incrementar la señal de la muestra sin incrementar la señal del blanco, haciendo más sensible la detección, aunque el tiempo del ensayo se incrementa.

La figura 12 muestra la mejora de la determinación mediante el aumento del tiempo de inmunocaptura. La tabla de la figura 12 presenta una comparación entre dos realizaciones particulares de la presente invención para la medición de la concentración de *Legionella* en aguas. En una realización (a) el análisis comprende un evento de captura de 15 minutos, y en la otra realización (b) el análisis comprende un evento de captura de 16 horas (toda la noche). Los resultados demuestran que mediante b es posible incrementar la señal de la muestra sin incrementar la señal del blanco, haciendo más sensible la detección, aunque el tiempo del ensayo se incrementa. En cualquier caso cualquiera de las dos realizaciones particulares propuestas por la presente invención da lugar a resultados fiables

La figura 13 muestra la discriminación entre bacterias muertas y bacterias vivas en la detección de *Legionella pneumophila*. La tabla de la figura 13 presenta los resultados obtenidos con el kit al analizar muestras con células vivas de *Legionella pneumophila* y células muertas de *Legionella pneumophila*, en diferentes concentraciones. La figura muestra como gracias a la presente invención las células muertas que han sido inactivadas, y no son detectadas para ninguna concentración ensayada, mientras que las células vivas son detectadas proporcionalmente a su concentración.

La figura 14 muestra la comparación de resultados cuantitativos de análisis de muestras de aguas industriales mediante PCR y mediante la presente invención.

La tabla de la figura 14 muestra la comparación de los análisis de determinación de concentración de *Legionella* de dos tipos de muestras de aguas (de torres de refrigeración y de aguas residuales), mediante el cultivo en placa, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y mediante el método de la presente invención. Los resultados muestran un alto grado de concordancia

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la detección y/o semicuantificación *in situ* de microorganismos en una muestra, que comprende las etapas de:

a) mezclar la muestra a ensayar, con una suspensión de partículas superparamagnéticas que tienen unido a su superficie un anticuerpo dirigido específicamente contra el microorganismo que se quiere determinar; estando la superficie activa de la partícula no ocupada por anticuerpo, ocupada por al menos un agente bloqueante, adsorbido sobre dicha superficie, en condiciones de pH, fuerza iónica y concentración tales que al diluir la suspensión con la muestra, dichas condiciones permitan mantener una presión constante de moléculas del agente bloqueante sobre la superficie de dichas partículas no ocupadas por el anticuerpo; en consecuencia, el equilibrio entre las moléculas de bloqueante unidas y libres se mantiene en todo momento desplazado hacia las

moléculas bloqueantes unidas. Dicha suspensión contiene también al menos un detergente no iónico y al menos un agente quelante, para minimizar la agregación de las partículas, sin que afecte la interacción antígeno-anticuerpo.

b) incubar dicha mezcla durante un tiempo determinado en condiciones adecuadas para permitir formar los complejos microorganismo-partícula magnética;

c) aplicar un campo magnético para la separación y concentración de los complejos microorganismo-partícula magnética formados; y evacuación del sobrenadante;

d) resuspender los complejos microorganismo-partícula magnética lavados en una disolución amortiguadora del pH, que comprende al menos un tipo de molécula bloqueante en exceso y un segundo anticuerpo marcado con un marcador (una enzima o un fluoróforo);

e) incubar la mezcla durante un tiempo determinado para formar los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética;

f) aplicar un campo magnético para la separación y concentración de los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética formados;

g) lavar las partículas para eliminar el exceso del segundo anticuerpo, y evacuación del sobrenadante;

h) resuspender los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética formados, en un medio líquido que contiene simultáneamente los sustratos necesarios para el revelado mediante la enzima que actúa como marcador de 1(d), un agente bloqueante a una concentración que permite mantener el equilibrio de adsorción desplazado hacia las moléculas de bloqueante unidas y un inhibidor específico de las enzimas intrínsecas que compiten por uno o varios de dichos sustratos y se seleccionan entre el grupo que consiste en azida sódica y triazol a una concentración del 0,01 % en una solución de tampón fosfato y citrato con una concentración de 50 mM y un sustrato para la enzima que actúa como marcador, seleccionado entre el grupo que consiste en peróxido de hidrógeno y peróxido de urea;

i) incubar la mezcla durante un tiempo determinado para revelar la señal;

j) detectar y cuantificar la señal que resulta de la formación de los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética, que a continuación se relaciona con la presencia y cuantificación del microorganismo buscado,

caracterizado por que el agente bloqueante usado es seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración del 0,1 - 10 %.

La presente invención aumenta la sensibilidad mediante una creación técnica que no implica el uso necesario de nanopartículas, sino que con micropartículas consigue sensibilidades de 1 célula/ml (1000 células/l), un orden de magnitud superior a la mejor sensibilidad conseguida mediante el uso de nanopartículas en el estado de la técnica.

En la presente invención "muestra" se considera la que es sospechosa de contener al microorganismo. La muestra generalmente será de origen ambiental o alimentario y en determinados casos será de fluidos biológicos, como por ejemplo, esputos, secreciones respiratorias o tejido pulmonar.

La presente invención utiliza que en general se preparan mediante las siguientes etapas:

a) preparación de una suspensión de partículas magnéticas con grupos carboxilo en su superficie a una concentración del 1%;

b) tratamiento químico de la suspensión de partículas magnéticas carboxiladas para que las partículas queden activadas, de forma que sean capaces de unirse covalentemente a un anticuerpo;

c) mezcla de las partículas magnéticas activadas con el anticuerpo para obtener partículas inmunomagnéticas, es decir, con el anticuerpo unido a su superficie;

d) tratamiento de las partículas inmunomagnéticas obtenidas en la etapa c) para bloquear la superficie no ocupada por el anticuerpo;

e) tratamiento de las partículas inmunomagnéticas bloqueadas obtenidas en la etapa d) para obtener una suspensión estable.

Las partículas magnéticas de la presente invención, están formadas a base de un polímero, generalmente poliestireno con un 45 - 48 % de pigmento magnético, preferiblemente con inclusiones de magnetita. Son de tipo esférico y el rango del diámetro es de 0,5 μm a 2 μm , preferiblemente de 0,7 μm a 1,5 μm , y más preferiblemente de 0,8 μm a 1,0 μm . Se funcionalizan químicamente, especialmente con grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ o $-\text{OH}$, preferiblemente con un 70- 85 $\mu\text{eq/g}$ de grupos $-\text{COOH}$, en su superficie. Otros soportes pueden ser activados del mismo modo, por ejemplo ferrofluidos, que comprenden partículas magnéticas del orden de los 200-400 nm de diámetro (nanopartículas), por ejemplo fabricadas por Chemicell.

En una realización del método mencionado, el tratamiento de la etapa b) se lleva a cabo con etilendicarbodiimida (EDC) y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS). La EDC soluble en agua forma un grupo funcional éster activo con los grupos carboxílicos de la partícula magnética, utilizando sulfo-NHS soluble en agua. Los ésteres de sulfo-NHS son grupos hidrófilos activos que reaccionan rápidamente con los grupos amino de los anticuerpos.

La presente invención proporciona el uso de un dispositivo de análisis reutilizable para la detección o cuantificación de un microorganismo de interés en una muestra ambiental o alimentaria, que comprende un soporte (1) que contiene una base (2) y dos planos inclinados laterales (3); un eje móvil (4) que soporta un imán (5) y permite su desplazamiento con respecto al soporte; al menos una sujeción en forma de pinza (7), y al menos una cubeta (6) que descansa sobre la base y está fijada en su posición por la sujeción en forma de pinza (7). Sobre la cubeta se aplica una muestra que contiene o potencialmente contiene el microorganismo de interés y en la que tiene lugar todas las etapas de la detección o cuantificación, que comprende: (a) formar una mezcla de ensayo para capturar selectivamente y separar el microorganismo de interés presente o potencialmente presente en la muestra con una suspensión de partículas superparamagnéticas sensibilizadas con una biomolécula de reconocimiento que se dirige selectivamente al microorganismo a detectar o cuantificar, incorporando dicha mezcla de ensayo un medio de captura cuya composición protege la partícula de la adsorción no específica y de la agregación entre partículas; (b) incubar dicha mezcla de ensayo en condiciones suficientes para permitir la unión de la biomolécula de reconocimiento al microorganismo de interés, formándose así un complejo partícula-microorganismo; (c) separar todas las partículas, incluidos los complejos partícula-microorganismo, mediante la aplicación de un campo magnético; (d) lavar todas las partículas en un medio de lavado que elimina los componentes potencialmente interferentes en las siguientes etapas del análisis, y protege la partícula de la adsorción no específica y de la agregación entre partículas; (e) formar una mezcla de ensayo por resuspensión de todas las partículas lavadas, que comprende, (i) una biomolécula de lectura que se dirige selectivamente al microorganismo a detectar o cuantificar y (ii) un medio de marcaje cuya composición protege la partícula de la adsorción no específica y la de la agregación entre partículas; (d) incubar dicha mezcla de ensayo en condiciones suficientes para permitir la unión de dicha biomolécula de lectura, formándose así un complejo partícula-microorganismo -biomolécula de lectura; (e) separar todas las partículas, incluidos los complejos partícula-microorganismo -biomolécula de lectura, mediante la aplicación de un campo magnético; (f) lavar todas las partículas en condiciones suficientes para eliminar la biomolécula de lectura no unida a los complejos partícula-microorganismo, en un medio que protege la partícula de la adsorción no específica y de la agregación entre partículas y (e) determinar la presencia o cantidad de dichos complejos partícula-microorganismo -biomolécula de lectura, en un medio de lectura cuya composición elimina las interferencias debidas al tipo celular objeto de la determinación en la muestra.

En la presente invención el anticuerpo no está limitado a un tipo particular y se pueden utilizar cualquier tipo de anticuerpo o fragmento conocido en el estado de la técnica que sea específico para el microorganismo a determinar, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, recombinantes, etc. Los anticuerpos pueden ser específicos para una especie de microorganismo o incluso un genotipo de una especie determinada, siendo este caso útil para determinar un contaminante concreto, como por ejemplo, *E. coli* O157:H7 en alimentos. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser reactivos con todo el género, la familia o incluso el orden de los microorganismos, siendo este caso útil cuando se quiere determinar si existe una contaminación general, y no de un organismo concreto.

Los métodos para la producción de anticuerpos, tanto de mucha o de poca especificidad, son conocidos por la persona experta en la materia. Generalmente, el método de la presente invención se utiliza para detectar al menos un microorganismo en una solución acuosa o suspensión. Así, el método comprende mezclar la solución o suspensión con las microesferas cubiertas con los anticuerpos. Ejemplos de anticuerpos son los que existen disponibles en el comercio, como por ejemplo, los de Bionova Científica, S.L. Generalmente en el método de la presente invención se utilizan anticuerpos policlonales porque un anticuerpo policlonal es en realidad una población de anticuerpos distintos, de modo que se puede amortiguar con dicha variación la variación de la expresión de los antígenos en la superficie de una célula bacteriana viva. Por ejemplo, en el caso de detección de *Legionella*, se podrían utilizar anticuerpos obtenidos en conejo utilizando como inmunógeno una preparación de células enteras de la cepa de *Legionella pneumophila* ATCC#33152, en el caso correspondiente. La cantidad adecuada de cada anticuerpo que se utiliza con las microesferas la puede determinar fácilmente un experto en la materia, utilizando experimentos de rutina.

En un aspecto de la invención, el tratamiento de la etapa e) se lleva a cabo mediante la mezcla de las partículas inmunomagnéticas bloqueadas con una disolución que contiene una cantidad en exceso del agente bloqueante empleado en la etapa d), un agente biocida, un agente bacteriostático, un agente tensioactivo y un agente quelante.

El agente bloqueante es seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración del 0,1 – 10 %.

Los agentes biocidas pueden ser, entre otros, estreptomina, neomicina, gentamicina, kanamicina, preferiblemente azida sódica.

Los agentes bacteriostáticos pueden ser, entre otros, p-nitrofenil-di-cloroacetamido propanodiol (cloranfenicol), sulfanilamida, 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)pirimidina (trimetoprim), preferiblemente sal sódica del 2-(etilmercuriomercepto) benzoico (timerosal).

Los agentes tensioactivos son fundamentalmente detergentes no iónicos, como por ejemplo, alquil fenoles polietoxilados, alcoholes grasos polietoxilados, ácidos grasos polietoxilados, alcanolaminas o condensados, etc., preferentemente el monolaurato de sorbitán (Tween 20).

Los agentes quelantes pueden ser, entre otros, 2,2'-Bipiridilo, dimercaptopropanol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilendioxo-dietileno-dinitrilo-tetraacético, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido nitrilotriacético (NTA), orto-fenantrolina, ácido salicílico y trietanolamina (TEA), preferiblemente EDTA.

5 En una realización particular, el agente bloqueante es seroalbúmina bovina (BSA), el agente bacteriostático es timerosal, el agente biocida es azida sódica, el agente tensioactivo es monolaurato de sorbitán, y el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

10 En una realización del método mencionado, en la etapa g) se añaden conservantes, como por ejemplo, timerosal para estabilizar el anticuerpo conjugado con peroxidasa. Se utiliza una sal débil de fosfato disódico para retrasar la autooxidación del co-sustrato utilizado en la reacción con la peroxidasa. Al mezclarlo con el otro co-sustrato, disuelto en un tampón fosfato-citrato, se restaura el pH para el que la actividad peroxidasa es óptima, de forma que el grado de autooxidación de los sustratos haya sido insignificante, y su concentración disponible para la peroxidasa sea
15 máxima, partiendo de un nivel despreciable de autooxidación. También se considera posible que la mezcla de co-sustratos con la sal débil sea ya estable, de modo que al final se mezcle con un tampón citrato-fosfato cuando entra en contacto con la peroxidasa, asegurando así que la reacción se produce con un mínimo nivel inicial de autooxidación y en el pH óptimo para la peroxidasa.

20 En una realización del método mencionado, en la etapa h) se añaden inhibidores de los enzimas endógenas competitivas de la peroxidasa, como por ejemplo, 3-amino-1,2,4-triazol, que inactiva selectivamente la catalasa microbiana que podría competir con la peroxidasa por el sustrato de revelado (peróxido de hidrógeno), pero no inhibe la peroxidasa. Otra posibilidad es utilizar un peróxido sustituido que no sea reconocible por la catalasa, pero sí por la peroxidasa, por ejemplo el peróxido de urea.

25 Mediante el bloqueo de la superficie de la partícula no ocupada por el anticuerpo se evita por un lado la adsorción sobre las partículas de otras moléculas presentes en la muestra, es decir, la adsorción no específica que puede entorpecer la captura del microorganismo de interés (favoreciendo falsos negativos), y por otro lado se evita también la adsorción sobre las partículas de las moléculas que se utilicen en la lectura de los microorganismos capturados
30 (favoreciendo falsos positivos).

También se evita la adsorción del anticuerpo inmovilizado en la partícula magnética, porque la molécula de bloqueo impide que el anticuerpo inmovilizado se incline sobre la superficie y pueda quedar adsorbido sin exponer su región de reconocimiento al medio exterior. Se reduce la agregación de las partículas entre sí y se evita su adherencia a
35 otras superficies, como las paredes del recipiente que las contiene o en que se manipulan.

Las partículas inmunomagnéticas así obtenidas son estables en suspensión durante un largo período de tiempo y se concentran rápidamente en fracciones adecuadas mediante la aplicación de un campo magnético, redispersándose fácilmente al retirar el campo magnético con una suave agitación.

40 En la presente invención se consigue la manipulación cuantitativa de las partículas, mediante la estabilización de la suspensión de partículas aplicada a la determinación y además, durante todo el proceso de determinación, desde el contacto con la muestra hasta la obtención del resultado analítico, dichas condiciones son sostenidas en el tiempo.

45 Esta estabilización supone que las partículas en ningún momento queden adheridas a las superficies contenedoras, de forma que su número no disminuya durante el proceso de análisis, y de que no puedan interactuar con otros microorganismos o moléculas distintas del microorganismo que se quiere determinar y con cuya determinación puedan interferir.

50 Esta característica requiere bloquear la superficie de la partícula que no esté ocupada por un anticuerpo (el ligando usado para capturar el microorganismo específico). La superficie no bloqueada presenta una cierta reactividad, de modo que otras moléculas o microorganismos presentes en la muestra podrían interactuar e interferir en la interacción con el microorganismo que se quiere determinar. Existen métodos para recubrir las partículas u otros soportes mediante agentes bloqueantes como polímeros, por ejemplo de dextrano, mediante su unión covalente a la
55 superficie de la partícula. Pero estas técnicas no permiten un control reproducible del grado de recubrimiento conseguido, e incluso es bastante fácil llegar a recubrir parte de los anticuerpos de superficie, de modo que los resultados pueden ser muy variables o incluso comprometer la aplicación de las partículas.

60 Se conoce el uso de agentes bloqueantes en etapas concretas de la determinación en inmunoensayos, para proteger la superficie en soportes fijos, como las placas ELISA. La etapa de bloqueo se realiza incubando un tiempo la placa en un tampón que contenga un bloqueante. Parte de las moléculas bloqueantes se quedan adsorbidas, y las moléculas no adsorbidas son lavadas posteriormente, procediendo entonces al revelado de la determinación. En la composición de los tampones de lavado es habitual la presencia de sales de fosfato y de cloruro sódico. Sin embargo, estos compuestos (especialmente el cloruro sódico) pueden en poco tiempo desorber bloqueantes tales
65 como ciertas proteínas, quedando desprotegidas las superficies reactivas de las partículas, lo que puede favorecer

interacciones no específicas que pueden darse durante el análisis.

Es obvio que el uso de soportes libres, como las partículas magnéticas activadas con anticuerpos, permitirán un incremento de colisiones entre el anticuerpo y el antígeno (presente en el microorganismo), de modo que una parte, no todas, de estas colisiones supondrán interacción antígeno-anticuerpo, y la captura más eficiente del microorganismo en un tiempo dado. Pero del mismo modo pueden verse favorecidas interacciones no específicas de otras moléculas presentes en la muestra con grupos reactivos de la superficie de las partículas. Estas interacciones no deseadas podrían interferir sobre la interacción deseada antígeno-anticuerpo.

Por otro lado, tanto en los soportes fijos (por ejemplo placas ELISA) como libres (partículas o esferas), las etapas de lavado pueden afectar también el grado de protección de las superficies, bien por efecto de la composición de los tampones de lavado, bien por simple dilución y consecuente desplazamiento del equilibrio de adsorción del agente bloqueante, de modo que no es cierto que durante todo el tiempo de la determinación dichas superficies estén protegidas en el mismo grado.

En soportes libres, como las partículas en suspensión, las superficies a proteger son las de dichas partículas en suspensión, con movimiento libre. Este problema se ha abordado en la literatura mediante la aplicación de polímeros sintetizados del tipo poli-alcohol. Estos compuestos poliméricos se adicionan en una sola vez como etapa dentro de la fabricación de las partículas, y quedan directamente unidos a la superficie. En la presente invención se favorece la adsorción de las moléculas del agente bloqueante en todo momento. Para ello, el equilibrio de adsorción-desorción se mantiene en todo momento desplazado hacia la adsorción de la molécula de bloqueo. Preferentemente, este agente bloqueante es una proteína.

Puesto que el control de las reacciones implicadas en la deposición y unión covalente de polímeros sintéticos en la superficie del soporte no es reproducible, el grado de recubrimiento conseguido es muy variable, y de hecho es muy frecuente que una parte, y no siempre la misma, de anticuerpos inmovilizados en la superficie de la partícula, puedan quedar también recubiertos, perdiendo su capacidad para interaccionar con el antígeno.

Esto es así, porque la química utilizada afecta siempre a algunos de los muy diversos grupos reactivos que presentan los anticuerpos, siendo inevitable que los polímeros interaccionen con algunos de ellos, o bien porque el polímero queda depositado total o parcialmente sobre algunos anticuerpos, causando un impedimento estérico a la interacción con el antígeno.

Resulta por tanto necesario conseguir una inertización de la partícula que sea reproducible y que no dependa de las condiciones cambiantes del entorno durante el proceso de la determinación del microorganismo.

La presente invención resuelve el problema y consigue la inertización mediante un procedimiento basado en el mantenimiento de una presión constante de agente bloqueante durante todo el proceso de la determinación, tanto en las incubaciones, lavados y separaciones. De este modo, el número de moléculas de bloqueante que abandonan la superficie en un momento dado, sea siempre compensado por un número equivalente de moléculas del bloqueante que entren a ocupar su sitio. Esto implica considerar los siguientes aspectos:

- a) la adición del bloqueante como etapa final del proceso de fabricación del inmunorreactivo (la partícula con los anticuerpos inmovilizados), a una concentración tal que, al añadir la cantidad prevista de suspensión a una muestra para realizar un análisis, la dilución obtenida permita mantener una concentración óptima del bloqueante;
- b) la introducción del bloqueante en todas las disoluciones intervinientes en el análisis, de modo que la concentración óptima de bloqueante se mantenga durante todas las etapas del análisis;
- c) la interacción del bloqueante con la superficie no requiere unión covalente, sino que se basa en interacciones débiles multipuntuales, estableciendo una adsorción al soporte, cuyo equilibrio es desplazado hacia la unión con el soporte. Es un sistema "dinámico" de protección de las partículas activadas con los anticuerpos, que evita la necesidad de un polímero de síntesis y la introducción de enlaces covalentes.

De este modo, la presente invención proporciona un procedimiento de determinación robusto, caracterizado por que los siguientes efectos son sostenidos en el tiempo:

- 1) la superficie de la partícula no queda desprotegida, y en consecuencia se minimizan las adsorciones no específicas;
- 2) los anticuerpos no puedan aproximarse al soporte en su movimiento de balanceo alrededor de su punto de anclaje, y adsorberse en el propio soporte, y en consecuencia no hay pérdida de actividad biológica;
- 3) la manipulación de las partículas, las partículas con los anticuerpos, las partículas con los inmunocomplejos, y las partículas con los inmunocomplejos marcados (para medir), es en todo momento cuantitativa, eliminando su influencia en la variabilidad de la medida, a diferencia de lo que ocurre con un ELISA o incluso con partículas magnéticas convencionales, con independencia de su composición.

Un aspecto de gran interés es que debido a la protección sostenida de la superficie de la partícula frente a la adsorción no específica, es posible incrementar la cantidad de anticuerpo de lectura en condiciones de fuerza iónica baja, para incrementar la probabilidad de colisión entre el microorganismo capturado sobre las partículas y dicho anticuerpo de lectura. Esto es posible porque en condiciones de baja fuerza iónica las repulsiones electrostáticas, entre el anticuerpo de lectura y el antígeno expuesto en la superficie del microorganismo capturado, son reducidas. En consecuencia el anticuerpo de lectura puede aproximarse mejor al antígeno, y un mayor número de colisiones favorables pueden darse en menor tiempo. Al mismo tiempo, se encuentra favorecida la interacción de la molécula de bloqueo con la superficie de la partícula no ocupada por el anticuerpo de captura. Por tanto, ocurren a la vez una eficiente protección de la superficie de la partícula frente a la adsorción no específica, y una eficiente interacción antígeno-anticuerpo. En consecuencia aumenta la sensibilidad de la determinación, manteniendo una relación señal/ruido elevada.

Otro aspecto del mayor interés es que la manipulación cuantitativa de las partículas en este entorno controlado y constante permite manejar volúmenes grandes de muestra, e incrementar la sensibilidad de la determinación. Es posible incrementar la sensibilidad, mediante el incremento del volumen de muestra, que es una limitación muy importante en otras técnicas de inmunoensayo, como la técnica ELISA.

En la presente invención, también es posible aumentar la sensibilidad, mediante la aplicación de varias cargas (cantidades equivalentes en volumen) de la misma muestra sobre las mismas partículas. Cuando la captura se realiza sobre una carga determinada de muestra, en los momentos iniciales sabemos que hay un número muy grande de células del microorganismo, de modo que el encuentro entre partícula y microorganismo es muy favorable, produciéndose la captura del mismo mediante la interacción antígeno-anticuerpo.

En general, a medida que transcurre el tiempo, la población de partícula "vacía" (sin microorganismo unido) disminuye en favor de la población de partícula que ha capturado el microorganismo; los microorganismos libres también decrecen en número en la muestra, y cada vez las partículas se hacen menos eficientes en la captura, porque ya llevan unidas células del microorganismo, que dificultan la entrada de otra célula más, y porque queda menos microorganismo libre en la muestra y las colisiones favorables son menos probables. Es por esto que, los tiempos de incubación en los inmunoensayos suelen ser largos, de entre 30 min y tres horas, por ejemplo.

En una realización particular, la presente invención proporciona un procedimiento para mejorar el rendimiento de captura sin alterar el tiempo de incubación, o incluso reduciéndolo, que consiste en dividir la muestra en alícuotas equivalentes y homogéneas (cargas), y someter una primera carga al contacto con las partículas magnéticas activadas con el anticuerpo, durante un tiempo menor t_1 ; luego retener las partículas, eliminar la muestra y sustituirla por una carga fresca de muestra, de modo que las mismas partículas (empobrecidas en el sentido de que ahora son capaces de captar menos células porque parte de su superficie ya está ocupada), se encuentran en un entorno de nuevo con la misma concentración de bacteria libre, favoreciendo nuevas interacciones, durante un tiempo t_2 que puede ser mayor que t_1 ; y así cuantas cargas se precisen. Así, $T = t_1 + t_2 + \dots + t_n$, siendo T el tiempo total de inmunocaptura (Figura 11).

En otra realización particular, la presente invención proporciona un procedimiento para incrementar la sensibilidad de la determinación del microorganismo de interés, mediante el incremento del tiempo de la etapa única de inmunocaptura, porque no se incrementa la adsorción no específica debido a la protección sostenida de la superficie de la partícula (Figura 13).

Así, la presente invención proporciona procedimientos para incrementar la sensibilidad de manera muy significativa, porque permite usar volúmenes de muestra mayores, y/o cargas sucesivas de una misma concentración de microorganismo, utilizando soportes que son constantemente protegidos frente a adsorciones no deseables, durante todo el proceso.

La presente invención proporciona un kit para la determinación de microorganismos. El alcance de dicha determinación puede ser semicuantitativo o cuantitativo; se entiende por determinación semicuantitativa aquella cuyo resultado es una estimación del orden de magnitud de la concentración del microorganismo de interés en la muestra. El kit permite la captura selectiva del microorganismo de interés, en muestras de agua o alimentarias, su concentración y separación del resto de componentes de la muestra, y su detección colorimétrica, de un modo simple y rápido, siendo posible la determinación *in situ*. El kit utiliza partículas superparamagnéticas con anticuerpos dirigidos contra el microorganismo de interés, inmovilizados en su superficie, que en los medios de reacción suministrados, se unen específicamente al microorganismo de interés, presente o potencialmente presente en la muestra. Un aparato portátil de sencillo manejo permite acercar y alejar un imán a la cubeta de reacción. Esto hace posible la retención y resuspensión de las partículas durante el análisis, para la captura, separación y concentración inmunomagnética del microorganismo de interés. Finalmente, el medio reactivo en la cubeta desarrolla un color que se compara con una carta de colores, para determinar visualmente la presencia del microorganismo de interés, y estimar su orden de magnitud, en un tiempo aproximado de 60 minutos entre la toma de muestra y la obtención del resultado.

En una realización particular, el kit comprende un aparato portátil de uso manual para análisis *in situ* y un conjunto de composiciones o medios reactivos para la realización del análisis, todo ello dispuesto en un contenedor que incorpora una placa refrigerante. Todas las etapas del análisis tienen lugar en dicho aparato, que comprende un soporte con dos cubetas y un imán, y una carta de colores para una correcta interpretación de los resultados. Dichas composiciones o medios reactivos son las siguientes:

- a) composición para la captura del microorganismo de interés, que comprende una suspensión de partículas inmunomagnéticas (con el anticuerpo de captura inmovilizado en su superficie mediante unión covalente, y un agente de bloqueo unido a la superficie no ocupada por el anticuerpo, mediante unión no covalente), en un medio líquido que contiene en disolución el mismo agente de bloqueo, un agente quelante, un agente tensioactivo, un agente biocida, y un agente bacteriostático. Dicha composición presenta fuerza iónica elevada correspondiente a un tampón de fosfato sódico de concentración 150 mM.
- b) composición de marcaje del microorganismo de interés, que comprende un anticuerpo de lectura, conjugado con una molécula de lectura, por ejemplo peroxidasa o una sustancia fluorescente, en una disolución que contiene un agente de bloqueo y un agente inhibidor de la actividad de enzimas presentes en el microorganismo que puedan competir en la molécula de lectura. Dicha composición presenta una fuerza iónica media correspondiente a un tampón de fosfato-citrato 50 mM y pH 6,0.
- c) sustrato oxidable necesario para el revelado de la reacción de lectura, en una disolución que contiene una sal débil de fosfato disódico para reducir la autooxidación de dicho sustrato.
- d) sustrato oxidante, necesario para el revelado de la reacción de lectura, en una disolución de un tampón fosfato-citrato de pH 6,0 y concentración 50 mM.
- e) una composición de parada de la reacción de lectura, que comprende un ácido fuerte o una base fuerte, a una concentración entre 1M y 5 M, preferentemente 3M.
- f) una composición para el lavado de las partículas inmunomagnéticas que comprende un agente de bloqueo, un agente tensioactivo y un agente bacteriostático, con una fuerza iónica baja correspondiente a una disolución de un tampón de fosfato de sodio a pH 7,0 y concentración 25 mM, caracterizado por que el agente bloqueante es seroalbúmina bovina a una concentración del 0,1 – 10 %.

En una realización particular, la presente invención proporciona un equipo biosensor automatizado para la monitorización on-line de la concentración de *Legionella* en aguas, basado en la utilización de alícuotas desechables de partículas inmunomagnéticas anti-*Legionella*.

Se describe a continuación la configuración del biosensor para la monitorización continua de la concentración de *Legionella* en aguas. El biosensor es un sistema integrado que incluye:

- i) celdas para la reacción de captura y marcaje del microorganismo de interés, en este ejemplo *Legionella*.
- ii) celdas para la lectura de la absorbancia a la longitud de onda seleccionada o la fluorescencia a la longitud de emisión seleccionada.
- iii) un transductor óptico (un espectrofotómetro o espectrofluorímetro en el caso de la *Legionella*).
- iv) un circuito hidráulico para la manipulación de los diferentes líquidos,
- v) un microprocesador para el control secuencial del análisis y la adquisición de la señal
- vi) un ordenador para el tratamiento de los datos y su comunicación con el microprocesador.
- vii) dispositivos de agitación.
- viii) dispositivos de retención magnética.
- ix) dispositivos termostáticos.

La figura 2 muestra la configuración del biosensor. La captura y marcaje del microorganismo de interés, por un lado, y la lectura de señal obtenida, por otro, tienen lugar en celdas diferentes. El circuito hidráulico está compuesto de bombas peristálticas que permiten la manipulación de los líquidos. Un dispositivo de retención magnética permite la manipulación de las partículas inmunomagnéticas en una celda de reacción, en la que tiene lugar la captura y marcaje del microorganismo de interés, y la lectura de la señal tiene lugar en flujo en otra celda distinta, integrada en el componente transductor. La celda de reacción y el dispositivo de retención magnética se encuentran ubicados en un compartimiento termostaticado (B) para mantener la temperatura favorable para la interacción antígeno-anticuerpo y la temperatura óptima para la actividad de la molécula de lectura. Dicho compartimiento se encuentra a su vez dentro de otro compartimiento mayor (A) termostaticado a una temperatura favorable para la conservación de los reactivos y disoluciones que intervienen en el análisis.

En cada ciclo de medida tiene lugar la captura, separación y concentración del microorganismo de interés presente en la muestra, y posteriormente su lectura. En una primera etapa del ciclo tiene lugar la medición de un blanco que comprende una disolución libre del microorganismo de interés, y en una segunda etapa tiene lugar la medición del microorganismo de interés en la muestra. El aparato registra la lectura del blanco y la lectura de la muestra (figura 3), y calcula la diferencia entre ambas, cuyo valor está correlacionado con la concentración del microorganismo en la muestra (figura 4). Para ello, empleando el dispositivo automatizado representado en la figura 2 (cuyas distintas partes integrantes están identificadas entre paréntesis a continuación) se añaden en cada caso, tanto para el blanco como para la muestra, cantidades predeterminadas de las siguientes composiciones en el siguiente orden: (a) un

volumen predeterminado de muestra es transferido desde el punto de toma de muestra mediante una bomba peristáltica (6) hasta la celda de reacción (11), ubicada en un compartimiento termostatzado (B); (b) una alícuota de una composición que contiene la suspensión de partículas inmunomagnéticas, previa homogenización mediante un dispositivo de agitación (16), es transferida desde el reservorio correspondiente (15) mediante una bomba peristáltica (3) hasta la celda de reacción (11); c) la mezcla de la muestra y las partículas inmunomagnéticas se homogeniza mediante un dispositivo de agitación (17), a intervalos regulares de tiempo, durante un período predeterminado, para que el microorganismo de interés pueda ser capturado por las partículas inmunomagnéticas mediante la interacción antígeno-anticuerpo, formando complejos partícula-microorganismo; d) aplicación de un campo magnético mediante la activación del dispositivo de retención magnética (12), de forma que las partículas inmunomagnéticas, tanto libres como las que han formado complejos con el microorganismo de interés, son retenidas en una zona de la celda de reacción (11); e) evacuación del líquido sobrenadante a residuo mediante una bomba peristáltica (8); f) eliminación del campo magnético aplicado mediante la desactivación del dispositivo de retención magnética (12); g) un volumen predeterminado de una composición que contiene un anticuerpo dirigido contra el microorganismo de interés, denominado anticuerpo de lectura porque está conjugado con una molécula de lectura, por ejemplo peroxidasa, es transferido desde su reservorio (14) hasta la celda de reacción (11), mediante una bomba peristáltica (2); h) la mezcla de las partículas inmunomagnéticas con la composición anterior en la celda de reacción (11) es homogenizada mediante agitación con un dispositivo de agitación (17), a intervalos regulares de tiempo, durante un período predeterminado, para que dicho anticuerpo de lectura pueda unirse al microorganismo capturado sobre las partículas inmunomagnéticas; i) aplicación de un campo magnético mediante la activación del dispositivo de retención magnética (12), de forma que las partículas inmunomagnéticas, tanto libres como las que han formado complejos con el microorganismo de interés y el anticuerpo de lectura, son retenidas en una zona de la celda de reacción (11); j) evacuación del líquido sobrenadante a residuo mediante una bomba peristáltica (8); k) eliminación del campo magnético aplicado mediante la desactivación del dispositivo de retención magnética (12); l) un volumen predeterminado de una composición que permite el lavado de las partículas inmunomagnéticas es transferido desde su reservorio (20) hasta la celda de reacción (11) mediante una bomba peristáltica (7); ll) la mezcla de las partículas inmunomagnéticas y la composición de lavado se homogeniza con un dispositivo de agitación (17); m) aplicación de un campo magnético mediante la activación del dispositivo de retención magnética (12), de forma que las partículas inmunomagnéticas lavadas, son retenidas en una zona de la celda de reacción (11); n) el líquido sobrenadante es evacuado desde la celda de reacción (11) a residuo mediante una bomba peristáltica (8); o) eliminación del campo magnético aplicado mediante la desactivación del dispositivo de retención magnética (12); p) un volumen predeterminado de una composición que contiene los sustratos de la enzima peroxidasa (composición de lectura) es transferido desde su reservorio (13) hasta la celda de reacción (11) mediante una bomba peristáltica (4); q) la mezcla de las partículas inmunomagnéticas y la composición anterior se homogeniza con un dispositivo de agitación (17), durante un período determinado, en el cuál la peroxidasa cataliza la obtención de un producto coloreado soluble; r) un volumen predeterminado de un reactivo de parada es transferido desde su reservorio (21) hasta la celda de reacción (11) mediante una bomba peristáltica (5), para detener la reacción producida por la molécula de lectura; rr) aplicación de un campo magnético mediante la activación del dispositivo de retención magnética (12), de forma que las partículas inmunomagnéticas son retenidas en una zona de la celda de reacción (11); s) el sobrenadante es transferido desde la celda de reacción (11) a residuo, haciéndolo pasar en flujo a través de la celda de lectura (18) mediante una bomba peristáltica (9); dicha celda alojada en un transductor óptico que permite el registro de las lecturas de absorbancia al paso de dicho sobrenadante para determinar la presencia o cantidad del microorganismo de interés.

El blanco se analiza del mismo modo que la muestra, y previamente a ésta; para ello el blanco es transferido desde su reservorio (22) a la celda de reacción (11) mediante la bomba peristáltica (1).

Finalmente, se compara la lectura obtenida para el blanco con la lectura obtenida para la muestra. Dicha comparación consiste en sustraer el valor máximo de absorbancia registrado para el blanco del valor máximo de absorbancia registrado para la muestra.

Concluido el ciclo de medida, el circuito hidráulico del biosensor es lavado haciendo pasar una disolución de limpieza desde su reservorio (19) hasta la celda de reacción (11) mediante una bomba peristáltica (10). La disolución de limpieza contenida en la celda de reacción (11) se agita mediante un dispositivo de agitación (17) durante un tiempo determinado, y se hace pasar por la celda de lectura (18) hacia residuo mediante una bomba peristáltica (9).

A continuación se describen algunos ejemplos aunque muchos otros están comprendidos dentro del alcance de la invención, de manera evidente para el experto en la materia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Detección de *Legionella* en una muestra de agua sanitaria.

Se utilizan partículas súper-paramagnéticas de poliestireno (diámetro medio de 0,9 µm, 45,7% de pigmento magnético-Estapor Merck Francia) que presentan grupos carboxílicos en su superficie. Sobre estas partículas se inmoviliza un anticuerpo policlonal anti *Legionella*. Las partículas inmunomagnéticas se incubaron en una disolución

de un tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 con BSA 1% durante 12 horas, en agitación suave. Las partículas inmunomagnéticas resultantes fueron suspendidas en una proporción 1/40 en una disolución de un tampón fosfato 150 mM que contiene 10% de BSA, 1,0 % de tween 20, 0,01% de timerosal, y 0,1 % de azida sódica. La suspensión final de partículas inmunomagnéticas es depositada en un aparato portátil para análisis *in situ*, similar al que es presentado en la figura 1 y descrito anteriormente

Con el imán alejado de la cubeta, un volumen de 1,0 ml de la suspensión de partículas inmunomagnéticas se deposita en el interior de la cubeta, y a continuación un volumen de 10,0 ml de muestra de agua procedente directamente de una torre de refrigeración se añade sobre las partículas inmunomagnéticas, formando una mezcla que se homogeniza mediante agitación suave del aparato y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo de incubación, el imán se aproxima hasta contactar con la pared exterior de la cubeta y las partículas inmunomagnéticas son atraídas y retenidas en la zona adyacente al imán, en la pared interna de la cubeta. El sobrenadante es evacuado de la cubeta, sin arrastrar las partículas inmunomagnéticas retenidas por el campo magnético.

A continuación, las partículas inmunomagnéticas retenidas en la cubeta son resuspendidas en un volumen de 1,0 ml de una disolución de un tampón fosfato-citrato 50 mM a pH 5,0, que contiene 0,1 % de BSA, 0,01 % de timerosal, y 4,0 µg/ml de un anticuerpo policlonal anti *Legionella* spp. conjugado con peroxidasa. Esta mezcla es homogeneizada mediante agitación suave del aparato, e incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de la incubación, el imán se aproxima hasta contactar con la pared exterior de la cubeta y las partículas inmunomagnéticas son atraídas y retenidas en la zona adyacente al imán, en la pared interna de la cubeta. El sobrenadante es evacuado de la cubeta, sin arrastrar las partículas inmunomagnéticas retenidas por el campo magnético.

Las partículas inmunomagnéticas son lavadas mediante su resuspensión, con el imán alejado de la cubeta, en un volumen de 4,0 ml de una disolución de un tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 que contiene un 1% de BSA, 0,1 % de tween 20, y 0,1 % de timerosal, y reteniendo a continuación dichas partículas inmunomagnéticas lavadas, de nuevo mediante la aproximación y contacto del imán con la cubeta, para evacuar el sobrenadante. Esta etapa de lavado se ejecuta dos veces más.

Siguiendo al último lavado, el campo magnético es eliminado, es decir, el imán se aleja de la cubeta; las partículas inmunomagnéticas son resuspendidas en un volumen de 1,0 ml de una disolución de un tampón fosfato-citrato 50 mM a pH 5,0, que contiene peróxido de urea 0,5% y ácido amino salicílico al 0,1 %. Esta mezcla se homogeniza mediante agitación suave del aparato, y es incubada a temperatura ambiente durante 2 minutos. Durante este tiempo, la peroxidasa conjugada al anticuerpo policlonal anti *Legionella*, a su vez unido a los complejos formados por las partículas inmunomagnéticas y las células de *Legionella* capturadas, catalizan la oxidación del ácido aminosalicílico por el peróxido de urea. Esta reacción da lugar a una coloración de la mezcla en el aparato.

Transcurrida la incubación, se añade sobre la mezcla 0,15 ml de una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) 3 M, para detener la reacción catalizada por la peroxidasa. Transcurrido 1 minuto, después de la incubación, el imán se aproxima hasta contactar con la pared exterior de la cubeta y las partículas inmunomagnéticas son atraídas y retenidas en la zona adyacente al imán, en la pared interna de la cubeta.

La producción de una coloración es interpretada como un resultado positivo en la detección de *Legionella*, y la ausencia de coloración como un resultado negativo. La intensidad de la coloración final obtenida permite estimar visualmente el orden de magnitud de la concentración de *Legionella* (expresada como unidades formadoras de colonia por litro, ufc/l)(Figura 7).

El sobrenadante puede ser evacuado para realizar la lectura de su absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. Con respecto a la lectura de absorbancia de un blanco, dicha absorbancia guarda una correlación con la concentración de *Legionella* en la muestra (figura 2).

Esta absorbancia es proporcional a la cantidad de *Legionella* capturada por las partículas inmunomagnéticas, que a su vez es proporcional a la cantidad de *Legionella* presente en la muestra.

Los resultados obtenidos para muestras distintas concentraciones de *Legionella*, con 15 réplicas por muestra, son coherentes entre el método de cultivo y el método proporcionado en la presente invención, tanto cualitativa como cuantitativamente (figura 8).

Estos resultados confirman la validez de los procedimientos que proporciona la presente invención para la detección y/o semicuantificación o cuantificación de microorganismos vivos a partir de una muestra.

Ejemplo 2: Análisis cuantitativo de aguas industriales (torres de refrigeración y aguas residuales).

De acuerdo con el procedimiento proporcionado en la presente invención en el ejemplo 1, se analizaron dos tipos de

muestras de aguas: muestras procedentes de torres de refrigeración y muestras procedentes de aguas residuales. Para cada tipo de muestra se determina la concentración de *Legionella* mediante el cultivo en placa, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se realiza el análisis por el método de la presente invención, obteniendo la lectura de la absorbancia a 550 nm. El volumen de cada muestra ensayado con el método de la invención es de 10,0 ml y las muestras no han sido pretratadas.

Como puede observarse en la figura 14, los resultados obtenidos indican un alto grado de concordancia entre la concentración de *Legionella* en la muestra y la lectura de absorbancia a 550 nm, para los dos tipos de muestra ensayados.

En consecuencia, el método proporcionado por la presente invención permite obtener una estimación fiable de la concentración de *Legionella* en distintos tipos de aguas, con ventajas significativas respecto de las otras técnicas utilizadas, y en particular, el tiempo de obtención del resultado, inferior a una hora, la posibilidad de ejecutar el análisis *in situ*, y sin la necesidad de supervisión profesional en un entorno controlado de laboratorio.

Ejemplo 3: Cuantificación de *Legionella* mediante un biosensor automatizado.

En este ejemplo se presenta los resultados obtenidos para muestras de agua sanitaria con distintas concentraciones de *Legionella*, con 7 réplicas por muestra, mediante el uso del equipo biosensor automatizado descrito (figura 3), para la monitorización on-line de la concentración de *Legionella* en aguas, basado en la utilización de alícuotas desechables de partículas inmunomagnéticas anti *Legionella*.

Cada ciclo de medida comprende el análisis de un blanco y el análisis de una muestra, y las señales correspondientes son registradas por el biosensor automatizado (figura 4). El valor de absorbancia resultante de sustraer la señal del blanco de la señal de la muestra tiene una correlación elevada con la concentración de *Legionella* en la muestra de agua sanitaria (coeficiente de correlación $r = +0,99$) (figura 2).

Según muestra la figura 5, los resultados obtenidos mediante el método de cultivo y el método proporcionado en la presente invención para el biosensor automatizado son comparables. El ciclo de medida tiene una duración de 1 hora por muestra analizada.

Esto sugiere que el biosensor puede ser utilizado para la monitorización y vigilancia de la concentración de *Legionella* en aguas, principalmente en las instalaciones de riesgo, e incluso para aplicar de una forma oportuna y proporcionada la dosificación de biocidas u otras medidas correctoras. De forma particular, el biosensor puede ser utilizado para prevenir que las instalaciones de riesgo alcancen concentraciones infectivas de *Legionella* sostenidas en el tiempo, reduciendo la probabilidad del riesgo asociado. Estas concentraciones para torres de refrigeración y dispositivos análogos han sido reportadas, estableciendo como tales aquellas concentraciones que alcanzan o superan 10^4 - 10^5 ufc/L (World Health Organization, "Legionella and the prevention of legionellosis", 2007). Estas concentraciones han sido determinadas por cultivo, en un tiempo de 12-15 días. Teniendo en cuenta que la concentración de *Legionella* puede multiplicarse en un factor de 10 o 100 en unos minutos en una instalación de riesgo (Bentham & Broadbent, "The Influence of the Sessile Population in the *Legionella* Colonization of Cooling Towers. In: *Legionella – Current Status and Emerging Perspectives*, Eds. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. and Dufour, A.P., ASM Press. Washington, DC., 1993), el método de cultivo no puede utilizarse con la finalidad de prevención sino únicamente como herramienta de verificación.

Sin embargo el biosensor presentado por la presente invención puede ser incorporado en las instalaciones de riesgo para una monitorización on-line de la concentración de *Legionella*, sin necesidad de supervisión profesional, haciendo posible una estrategia eficiente de prevención del riesgo biológico asociado a *Legionella*.

Ejemplo 4: Comparación del efecto protector frente a la adsorción no específica de un recubrimiento estático frente a un recubrimiento dinámico de la partícula.

Se ha realizado una comparación del efecto protector de dos tipos distintos de inertización de la superficie de la partícula inmunomagnética. Por un lado, mediante la unión covalente de un polímero de dextrano-aspártico-aldehído (DAA), y por otro lado, siguiendo lo descrito por la presente invención, mediante la unión no covalente de una proteína, seroalbúmina bovina (BSA) y el mantenimiento de su concentración en exceso en el microambiente de las partículas inmunomagnéticas, dichas partículas bloqueadas previamente con dicho agente de bloqueo.

Se aplicó el protocolo especificado a continuación por separado a los dos tipos de partícula inmunomagnética anti *E. coli*. En uno de ellas dichas partículas estaban bloqueadas con BSA, y en el otro caso estaban bloqueadas con DAA. En todos los casos se mantiene un exceso de BSA durante todo el análisis. Para cada tipo de partícula se aplicó el protocolo con cuatro muestras de 0, 10, 10^2 , y 10^3 ufc/ml de *E. coli*.

Esta comparación se realiza de acuerdo con el siguiente protocolo: i) adición de 25 μ l de una suspensión de partícula inmunomagnética anti *E. coli* sobre 4,0 ml de la muestra (todas las muestras con 2% de BSA en fosfato 150 mM a pH 7,0); ii) agitación suave durante 15 minutos a temperatura ambiente; iii) retención de las partículas

inmunomagnéticas y evacuación del sobrenadante; iv) Tres lavados consecutivos con una disolución de un tampón fosfato 150 mM a pH 7,0 y 2% de BSA, y un último lavado con una disolución de un tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 y 2% de BSA; v) resuspensión de la partícula inmunomagnética en 1,0 ml de una disolución de un tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 y 2% de BSA, que contiene un anticuerpo anti *E. coli* obtenido en conejo (dilución 1/200); vi) agitación suave durante 15 minutos a temperatura ambiente; vii) tres lavados consecutivos con una disolución de un tampón fosfato 150 mM a pH 7,0 y 2% de BSA, y un último lavado con una disolución de un tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 y 2% de BSA; viii) resuspensión de la partícula inmunomagnética en 1,0 ml en una disolución de un tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 y 2% de BSA, que contiene un anticuerpo anti conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1/1000); ix) agitación suave durante 15 minutos a temperatura ambiente; x) tres lavados consecutivos con una disolución de un tampón fosfato 150 mM a pH 7,0 y 2% de BSA, y un último lavado con una disolución de un tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 y 2% de BSA; xi) resuspensión de la partícula inmunomagnética en 1,0 ml de una disolución de ABTS 5mM, en un tampón fosfato 50 mM a pH 6,0, y H₂O₂ al 0,03%; y xii) lectura de la absorbancia a 405 nm en función del tiempo.

15 Tal y como muestra la tabla de la figura 9, las partículas inmunomagnéticas bloqueadas con BSA y sometidas a una presión de BSA constante durante todo el análisis según propone la presente invención, permiten discriminar todas las concentraciones de *E. coli* ensayadas. Sin embargo, las partículas inmunomagnéticas bloqueadas con DAA no permiten discriminar las concentraciones de *E. coli* ensayadas

20 Esto sugiere que el DAA protege la partícula de la adsorción no específica pero dicho polímero recubre también las regiones de reconocimiento de los anticuerpos inmovilizados, de forma que impide la interacción antígeno-anticuerpo y en consecuencia la captura de las células de *E. coli*.

Ejemplo 5: Efecto de la protección continuada de la partícula inmunomagnética frente a la adsorción no específica de la molécula de lectura.

25 Se aplicó dicho protocolo por separado a dos alícuotas de 25 µl de partícula inmunomagnética, ambas inicialmente bloqueadas con BSA, pero en un caso con un 1 % de BSA en los tampones utilizados en las distintas etapas del protocolo, y en otro caso sin BSA.

30 Se ha determinado el efecto de la presencia de un agente bloqueante, seroalbúmina bovina (BSA), sobre la adsorción no específica de la molécula de lectura en la partícula inmunomagnética, manteniendo un exceso de concentración alrededor de la partícula inmunomagnética, durante todas las etapas del análisis. Dicho análisis se realiza de acuerdo con el siguiente protocolo: i) suspensión de 25 µl de partícula inmunomagnética con un anticuerpo anti *E. coli* obtenido en cabra, inmovilizado en su superficie, en un volumen de 1,0 ml de un tampón fosfato 150 mM, pH 7,0; ii) agitación suave durante 15 min a temperatura ambiente; iii) retención de las partículas inmunomagnéticas y evacuación del sobrenadante; iv) resuspensión de las partículas inmunomagnéticas en 1,0 ml de una disolución 1/200 de un anticuerpo anti *E. coli* obtenido en conejo, en un tampón fosfato 150 mM, pH 7,0; v) agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente; vi) Cinco lavados consecutivos con una disolución de un tampón fosfato 25 mM, pH 7,0; retención de las partículas inmunomagnéticas y evacuación del sobrenadante; vii) resuspensión de las partículas inmunomagnéticas en 1,0 ml de una disolución 1/200 de un anticuerpo de lectura anti conejo, conjugado con peroxidasa; viii) agitación suave durante 15 min a temperatura ambiente; ix) Tres lavados consecutivos con una disolución de un tampón fosfato 25 mM, pH 7,0; retención de las partículas inmunomagnéticas y evacuación del sobrenadante; x) resuspensión de las partículas inmunomagnéticas en 1,0 ml de una disolución de ABTS 1 mM y H₂O₂ al 0,03 %.

45 Las partículas inmunomagnéticas bloqueadas que fueron procesadas mediante el protocolo que incluye una presión constante del agente bloqueante durante todo el análisis, mostraron una reducción de la adsorción no específica de la molécula de lectura, sostenida en el tiempo, con respecto de las partículas inmunomagnéticas bloqueadas procesadas mediante el protocolo equivalente pero que no incluye el agente bloqueante (Figura 10).

50 Esto sugiere que algunas moléculas bloqueantes inicialmente adsorbidas en la superficie de las partículas, se liberan al medio en las etapas de lavado con los tampones libres de bloqueante y en la dilución con la muestra. En consecuencia, pueden quedar expuestos grupos reactivos sobre los que se adsorbe de forma inespecífica el anticuerpo conjugado con la molécula de lectura. En esas condiciones, una parte importante de la lectura final del análisis se deberá a dicha adsorción no específica y la relación señal/ruido será reducida significativamente.

60 Por tanto, para generar partículas inmunomagnéticas que no adsorban de forma inespecífica la molécula de lectura, no es suficiente bloquear dicha interacción con pre-adsorción del bloqueante sobre las partículas; será necesario mantener una concentración suficiente de dicho bloqueante en el microambiente de la partícula durante todo el análisis, para obtener la máxima carga de bloqueante en la superficie, que permita mantener su efecto protector frente al lavado y la dilución.

Ejemplo 6: Dependencia de la lectura con la presencia de catalasa endógena activa en las células de *Escherichia coli* capturadas sobre las partículas magnéticas.

65

La figura 6 muestra la dependencia de la velocidad de la reacción de lectura (colorimetría) con la inhibición de la actividad catalasa de las células de *Escherichia coli* capturadas sobre las partículas magnéticas, a partir de una suspensión que contiene $1,1 \times 10^6$ ufc/ml.

5 Así, se prepararon dos muestras, cada una de las cuáles conteniendo un volumen de 1,5 ml de una suspensión de *E. coli* conteniendo $1,1 \times 10^7$ ufc/ml, sobre un volumen de 15,0 ml de una disolución tampón fosfato 20,0 mM a pH 7,0 con 1% de seroalbúmina bovina (BSA), de modo que la concentración final es de $1,1 \times 10^6$ ufc/ml en todas las muestras. En cada muestra se añade un volumen de 25,0 μ l de partículas magnéticas con un anticuerpo policlonal anti *E. coli*. La mezcla se incuba en agitación suave durante 90 minutos y a temperatura ambiente. Del mismo modo
10 se prepara un control cuya única diferencia con las muestras es que no contiene *E. coli*.

Después de la incubación, el control y las muestras se lavan tres veces con un volumen de 5,0 ml cada vez de una disolución de tampón fosfato 150 mM conteniendo un 2% de BSA. Después del tercer lavado, tanto en el control como en las muestras, los pellets que contienen partículas magnéticas libres y también los inmunocomplejos
15 formados entre las células de *Escherichia coli* y las partículas magnéticas, se resuspenden en un volumen de 1,0 ml de una disolución 1/ 200 de un anticuerpo policlonal anti *Escherichia coli* obtenido en conejo. Las mezclas se incuban en agitación suave y a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación, los pellets se lavan tres veces con un volumen de 5,0 ml cada vez de una disolución de tampón fosfato 150 mM conteniendo un 2% de BSA. A continuación, en una de las dos muestras, el pellet es resuspendido en una disolución de 1,0 ml de
20 3,2 mg/ml de azida sódica en tampón fosfato 150 mM con BSA y a pH 7,0. Después de la incubación, los pellets se lavan exhaustivamente con un volumen de 5,0 ml cada vez de una disolución de tampón fosfato 150 mM conteniendo un 2% de BSA (seis o más lavados). Finalmente, cada pellet se resuspende en un volumen de 1,0 ml de una disolución de un anticuerpo policlonal anti-conejo conjugado con peroxidasa. Las mezclas se incuban en agitación suave y a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación, los pellets se lavan tres
25 veces con un volumen de 5,0 ml cada vez de una disolución de tampón fosfato 150 mM conteniendo un 2% de BSA.

Para realizar el ensayo de la actividad peroxidasa, cada pellet se recoge en un volumen de 1,0 ml de una disolución 5 mM de ABTS y 50 mM de tampón fosfato a pH 7,0, y se añaden 15 μ l de H₂O₂ al 0,035 %. Todas las reacciones se monitorizaron durante 4 minutos, tomando una lectura de la absorbancia a 405 nm cada minuto.
30

La azida sódica inhibe la actividad catalasa presente en el interior de las células de *Escherichia coli* capturadas sobre las partículas magnéticas. Pero la azida sódica puede también inhibir a la peroxidasa conjugada con el anticuerpo policlonal anti-conejo unido a su vez al anticuerpo policlonal anti *Escherichia coli* obtenido en conejo unido a la superficie de las células capturadas, y en consecuencia es muy importante lavar exhaustivamente el pellet que contiene las células de *Escherichia coli* inmunocapturadas e incubadas con la azida sódica, antes añadir la disolución del anticuerpo conjugado con la peroxidasa.
35

La muestra en la que la catalasa no es inhibida está representada en la figura 5 por el símbolo cuadrado, y tiene la misma concentración de bacterias que la muestra en la que la actividad catalasa sí está inhibida, y que esta representada por el símbolo círculo.
40

Los resultados demuestran que si la enzima endógena del microorganismo capturado no es inhibida, dicha actividad puede competir con la molécula de lectura y dar lugar a una subestimación de la concentración del microorganismo en la muestra, proporcionalmente a la cantidad de células viables del microorganismo capturadas.
45

Este efecto incide en el volumen de muestra que puede utilizarse en el análisis. Para reducir el límite de detección del análisis es conveniente aumentar el volumen de la muestra, de forma que el número total de células del microorganismo en la muestra sea mayor. Sin embargo, esto aumentaría la cantidad de enzima endógena que compite con la molécula de lectura y la probabilidad de obtener un falso negativo o una subestimación de la concentración del microorganismo sería mayor.
50

Ejemplo 7. Mejora de la sensibilidad de la determinación de *Legionella* en aguas mediante capturas sucesivas.

Durante el proceso de la inmunocaptura del microorganismo de interés, en este ejemplo *Legionella*, la velocidad de captura decrece con el tiempo debido a dos factores fundamentalmente:
55

- 1) Los puntos de unión para las bacterias son cada vez menos ya que van siendo ocupados (es posible que, dado el tamaño de la bacteria se produzcan, además, impedimentos estéricos).
- 2) La concentración de *Legionella* libre en el medio disminuye con el tiempo y se produce una disminución de la velocidad de captura, porque las colisiones son proporcionalmente menores.
60

Una solución para el primer punto consiste en aumentar la concentración de partícula magnética y por tanto de anticuerpo de captura, lo que ofrecería un mayor número de puntos de anclaje para el microorganismo. Sin embargo, también aumentaría la superficie activa de la partícula para una adsorción no específica.
65

Una solución para el punto segundo consiste en incrementar el tiempo de la etapa de inmunocaptura y compensar así la disminución de la velocidad de captura; si durante este tiempo prolongado la superficie de la partícula inmunomagnética no queda desprotegida, cabe esperar un aumento de la señal de la muestra sin incremento de la señal inespecífica. En una realización de la presente invención la etapa de inmunocaptura tiene una duración de un
 5 toda la noche (16 horas). La Figura 12 presenta los resultados obtenidos al incrementar el tiempo de la etapa de inmunocaptura de 15 minutos a 16 horas. La señal de la muestra se incrementa significativamente pero no la señal del blanco; esto sugiere que durante este período de tiempo siguen produciéndose la captura del microorganismo sin que las partículas inmunomagnéticas pierdan su protección frente a la adsorción no específica.

10 En otra realización particular de la presente invención, la determinación de *Legionella* se realiza mediante repeticiones de la etapa de inmunocaptura de forma que en cada etapa ocurre un cambio de la muestra por muestra fresca. Este procedimiento consiste en mantener constante la cantidad de partícula inmunomagnética (y por tanto de anticuerpo y potenciales puntos de anclaje), sometido en cada etapa a un mismo volumen de muestra fresca. Se realiza la primera captura con un volumen de 9,0 ml; se elimina el sobrenadante y se repite la captura con una nueva
 15 alícuota de muestra fresca de 9,0 ml. Este proceso se repite hasta tres veces (27,0 ml de muestra total). De esta forma, al comparar los resultados podemos comprobar la influencia de la concentración de *Legionella* en el medio durante el proceso de captura. La Figura 11 presenta una comparación entre dos posibles realizaciones de la presente invención para la determinación de *Legionella* en aguas, según que dicha determinación comprenda una sola captura (A) o varias capturas sucesivas (B). Este procedimiento incrementa el tiempo de ensayo
 20 aproximadamente en 40 minutos, pasando de 60 a 110 minutos, pero como se muestra en la Figura 11 incrementa la señal de la muestra aproximadamente en un 50%, sin variar la señal del blanco.

Ejemplo 8. Discriminación entre bacterias muertas y bacterias vivas en la detección de *Legionella pneumophila*.

25 Muestras de diferentes concentraciones de *Legionella pneumophila* fueron analizadas mediante el procedimiento cuantitativo proporcionado por en la presente invención. Además, se distinguen dos tipos de muestra; muestras en que la bacteria ha sido inactivada térmicamente, y muestras en las que tal inactivación no tiene lugar, de modo que las células del microorganismo permanecen viables. Dicha viabilidad es comprobada por cultivo, obteniendo los correspondientes recuentos.
 30

Para realizar los ensayos, se prepara un volumen de 9,0 ml de cada una de las suspensiones de la bacteria, y 9,0 ml de un blanco. Se aplica el procedimiento descrito en el ejemplo 1, tanto al blanco como a las muestras. Los resultados se presentan en la Figura 13. Como puede verse, las células inactivadas no son detectadas mientras que las células viables son detectadas y la señal correspondiente a cada suspensión ensayada depende de la
 35 concentración de *Legionella pneumophila*.

Esto sugiere que el procedimiento proporcionado en la presente invención podría ser utilizado para realizar una valoración rápida de la concentración de *Legionella* viable antes y después de una tratamiento de desinfección en una instalación de riesgo, y podría utilizarse para determinar la eficacia de un tratamiento desinfectante y la
 40 oportunidad de su aplicación.

Por lo tanto, se puede concluir que la presente invención aporta distintas ventajas sobre los métodos existentes, que se pueden resumir en:

- 45 a) La presente invención aumenta la sensibilidad mediante una creación técnica que no implica el uso necesario de nanopartículas, sino incluso de micropartículas, consiguiendo sensibilidades de 1 célula/ml, un orden de magnitud superior a la mejor sensibilidad conseguida mediante el uso de nanopartículas.
- b) Este procedimiento se basa en la obtención y utilización de partículas superparamagnéticas, principalmente micropartículas, en las que se ha inmovilizado un anticuerpo de forma directa y covalente, preferentemente
 50 policlonal, contra el microorganismo que se quiere determinar, suspendidas en un medio líquido cuya composición permite simultáneamente minimizar la agregación de las microesferas, minimizar las adsorciones no específicas y minimizar las interferencias de la muestra analizada, y cuya concentración permite mantener estos efectos frente a la dilución con la muestra que va a ser analizada.
- c) Esto hace posible obtener una recuperación eficiente del microorganismo basada en su inmunocaptura, por
 55 cuanto la probabilidad de interacción antígeno-anticuerpo es alta debido a que la superficie de la partícula expuesta a la colisión con el microorganismo es en todo momento elevada y la manipulación de las partículas es cuantitativa, y la probabilidad de interacción con cualquier otro componente químico o biológico presente en la muestra es reducida.
- d) Permite la realización de dicha determinación tanto *in situ*, con un valor semicuantitativo, como en laboratorio,
 60 con un valor cuantitativo, en un tiempo no superior a 1 hora, mediante el uso de un dispositivo mecanizado. El procedimiento puede ser automatizado para obtener un biosensor automático.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos en una solución o suspensión, que no contiene microorganismos precultivados, que comprende las etapas de:
- 5 a) mezclar la muestra sospechosa de contener el microorganismo con i) una suspensión amortiguadora de pH, que comprende al menos un tipo de partículas paramagnéticas que tienen, unido a su superficie, un anticuerpo de captura dirigido específicamente contra el microorganismo que se va a determinar; y ii) seroalbúmina bovina (BSA) en exceso sobre la superficie de dichas partículas magnéticas no ocupada por el anticuerpo;
- 10 b) incubar la mezcla durante un tiempo determinado en condiciones adecuadas para formar los complejos microorganismo-partícula magnética;
- c) aplicar un campo magnético para la separación y concentración de los complejos microorganismo-partícula magnética formados; y la posterior evacuación del sobrenadante;
- 15 d) resuspender los complejos microorganismo-partícula magnética en una solución amortiguadora de pH, que comprende al menos un tipo de agente de bloqueo en exceso y un segundo anticuerpo dirigido específicamente contra dicho microorganismo a un sitio distinto al que ya está unido el anticuerpo de captura, marcado con un marcador seleccionado entre una enzima o un fluoróforo;
- e) incubar la mezcla durante un tiempo determinado para formar los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética;
- 20 f) aplicar un campo magnético para la separación y concentración de los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética formados; y la posterior evacuación del sobrenadante;
- g) lavar las partículas para eliminar el exceso del segundo anticuerpo dirigido específicamente contra dicho microorganismo a un sitio distinto al que ya está unido el anticuerpo de captura, y la posterior evacuación del sobrenadante;
- 25 h) resuspender los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética formados en un medio líquido que contiene simultáneamente los sustratos necesarios para el marcador enzimático de 1(d), un agente de bloqueo que es seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración del 0,1 - 10 %, así manteniendo el equilibrio de adsorción desplazado hacia el agente bloqueo unido, y un inhibidor específico para las enzimas microbianas intrínsecas que compiten con dichos sustratos y se selecciona del grupo que consiste en azida disódica y triazol a una concentración del 0,01 % en una solución de tampón fosfato y citrato con una concentración de 50 mM, y un sustrato para la enzima marcadora, seleccionado entre el grupo que consiste en peróxido de hidrógeno y peróxido de urea;
- 30 i) incubar la mezcla durante un tiempo determinado para revelar la señal;
- j) detectar y cuantificar la señal que resulta de la formación de los complejos anticuerpo marcado-microorganismo-partícula magnética, relacionando dicha señal con la presencia y cuantificación del anticuerpo buscado.
2. Un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la muestra es de origen ambiental, de origen alimentario u obtenida de fluidos biológicos.
- 40 3. Un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos según las reivindicaciones 1-2, **caracterizado por que** el microorganismo es un organismo microscópico procariótico, preferiblemente una bacteria, o un organismo microscópico eucariótico, preferiblemente protozoos, algas, levaduras y hongos.
- 45 4. Un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos según la reivindicación 3, **caracterizado por que** el microorganismo es una bacteria.
5. Un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos según la reivindicación 4, **caracterizado por que** el microorganismo pertenece al grupo de las bacterias patógenas, seleccionado preferiblemente entre el grupo de especies de *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Legionella*, *Enterobacter*.
- 50 6. Un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado por que** el segundo anticuerpo dirigido específicamente contra dicho microorganismo a un sitio distinto al que ya está unido el anticuerpo de captura, y/o el anticuerpo de captura para el microorganismo de interés es monoclonal o policlonal.
- 55 7. Un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos según las reivindicaciones 1-6, **caracterizado por que** las partículas magnéticas son esféricas, siendo su rango de diámetro de 0,5 μm a 2 μm , o de 0,7 μm a 1,5 μm , o preferiblemente de 0,8 μm a 1,0 μm .
- 60 8. Un procedimiento para la detección de microorganismos según las reivindicaciones 1-7, **caracterizado por que** las partículas magnéticas están funcionalizadas químicamente, con grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ u $-\text{OH}$.
- 65 9. Un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos según las reivindicaciones 1-

8, **caracterizado por que** la sensibilidad de la detección es de 1 célula/ml.

10. Un procedimiento para detectar y/o semicuantificar y/o cuantificar microorganismos según las reivindicaciones 1-9, **caracterizado por que** el resultado se obtiene en un tiempo menor que o igual a una hora.

5 11. Un kit para llevar a cabo el procedimiento de las reivindicaciones 1-10, que comprende: un aparato portátil reutilizable según la figura 1 para uso manual para el análisis *in situ* según las reivindicaciones 1-10 y un conjunto de composiciones o medios reactivos para la realización del análisis, todo ello dispuesto en un contenedor que incorpora una placa refrigerante, en el que el conjunto de composiciones o medios reactivos es el siguiente:

- 10 a) composición para capturar el microorganismo de interés, que comprende una suspensión de partículas inmunomagnéticas (con el anticuerpo de captura inmovilizado sobre la superficie de las mismas mediante enlace covalente, y un agente de bloqueo unido a la superficie no ocupada por el anticuerpo, mediante unión no covalente), en un medio líquido que contiene en solución i) el mismo agente de bloqueo, ii) un agente quelante, iii) un tensioactivo, iv) un agente biocida, y v) un agente bacteriostático, y que tiene alta fuerza iónica,
- 15 correspondiente a una solución de tampón fosfato con una concentración entre 90 y 500 mM;
- 20 b) composición de marcaje para el microorganismo de interés, que comprende un segundo anticuerpo dirigido específicamente contra dicho microorganismo a un sitio distinto al que ya está unido el anticuerpo de captura, conjugado con un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en una enzima o una sustancia fluorescente, en una solución que contiene i) un agente de bloqueo y, en donde el marcador es una enzima, ii) un agente inhibidor de la actividad de enzimas presentes en el microorganismo que pueden competir con la enzima
- 25 marcadora seleccionado entre el grupo que consiste en azida sódica y triazol, y que tiene una fuerza iónica media correspondiente a una solución de tampón fosfato con una concentración entre 30 y 90 mM;
- 30 c) sustrato oxidable necesario para el revelado de la reacción de lectura, en una solución que contiene una sal de fosfato disódico débil para reducir la autooxidación de dicho sustrato seleccionada entre ácido 5-aminosalicílico, ortofenilendiamina y ácido 2,2'.azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico);
- d) sustrato oxidante, necesario para el revelado de la reacción de lectura, en una solución de tampón fosfato-citrato, seleccionado entre el grupo que consiste en peróxido de hidrógeno y peróxido de urea;
- e) una composición de parada para la reacción de lectura, que comprende un ácido fuerte o una base fuerte;
- f) una composición para lavar las partículas inmunomagnéticas que comprende un agente de bloqueo, un
- 35 tensioactivo y un agente bacteriostático, con una fuerza iónica baja correspondiente a una solución de tampón fosfato con una concentración entre 5 y 30 mM,

caracterizado por que dicho agente de bloqueo es seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración del 0,1 - 10% y por que el aparato portátil reutilizable para uso manual para el análisis *in situ* comprende un soporte con al menos dos cubetas y un imán, y una carta de colores para una correcta interpretación de los resultados.

12. Un kit según la reivindicación 11, **caracterizado por que** la fuerza iónica de a) corresponde a un tampón de fosfato sódico con una concentración entre 100 y 200 mM; la fuerza iónica de b) corresponde a un tampón fosfato citrato 50 mM y pH 6,0; la solución de tampón fosfato-citrato de d) tiene un pH de 6,0 y una concentración de 50 mM; la concentración de ácido fuerte o base fuerte de e) es entre 1 M y 5 M; y la fuerza iónica de f) corresponde a una solución de tampón de fosfato sódico a pH 7,0 y una concentración entre 20 y 30 mM.

13. Un kit según las reivindicaciones 11-12, **caracterizado por que**

- 45 - el agente inhibidor de la actividad enzimática competitiva se selecciona entre azida sódica y triazol, o un sustrato, para el marcador seleccionado entre peróxido de hidrógeno y peróxido de urea;
- el sustrato oxidable se selecciona entre orto-fenilendiamina, ácido 2,2'.azino-bis(3-etilbenzoazolin-6-sulfónico), y ácido 5-aminosalicílico;
- el ácido fuerte se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido sulfúrico;
- la base fuerte se selecciona entre hidróxido potásico e hidróxido sódico;
- 50 - la sal débil es fosfato dipotásico o disódico;
- el agente quelante se selecciona entre 2,2'-bipiridilo, dimercaptopropanol, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), ácido etilendioxo-dietileno-dinitrilo-tetraacético, ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido nitrilotriacético (NTA), orto-fenantrolina, ácido salicílico y trietanolamina (TEA);
- 55 - el tensioactivo se selecciona entre detergentes no iónicos seleccionados entre el grupo que consiste en alquifenoles polietoxilados, alcoholes grasos polietoxilados, ácidos grasos polietoxilados, alcanolaminas o condensados, y monolaurato de sorbitán (Tween 20);
- el agente bacteriostático se selecciona entre p-nitrofenil-di-cloroacetamido propanodiol (cloranfenicol), sulfanilamida, 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)pirimidina (trimetoprima), y sal de sódica del ácido 2-(etilmercuriomercurio)benzoico (timerosal);
- 60 - el agente biocida se selecciona entre estreptomina, neomicina, gentamicina, kanamicina, y azida sódica.

14. Un kit según las reivindicaciones 11-13, **caracterizado por que:**

- 65 a) en la composición para capturar el microorganismo de interés, en la suspensión, las partículas inmunomagnéticas son esféricas y tienen un diámetro medio entre 0,8 y 1,1 µm, el anticuerpo de captura es un

- anticuerpo anti-*Legionella* policlonal o monoclonal, unido covalentemente a la superficie de las partículas, el agente de bloqueo es seroalbúmina bovina a una concentración del 10%, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,1%, el tensioactivo es monolaurato de sorbitán al 1%, el agente biocida es azida sódica a una concentración del 0,1%, y el agente bacteriostático es timerosal a una concentración del 0,01%, todo ello en una solución de tampón fosfato con una concentración de 150 mM a pH 7,0; añadiéndose dicha composición a la mezcla a una proporción 1/10;
- b) en la composición de marcaje para el microorganismo de interés, el segundo anticuerpo dirigido específicamente contra dicho microorganismo a un sitio distinto al que ya está unido el anticuerpo de captura, es un anticuerpo anti-*Legionella* conjugado a peroxidasa, siendo i) el agente de bloqueo seroalbúmina bovina (BSA) al 0,1% y ii) el agente inhibidor de la actividad de enzimas presentes en el microorganismo que pueden competir con el marcador, triazol al 0,01% en una solución de fosfato y citrato con una concentración de 50 mM a pH 6,0, en la solución que los contiene;
- c) el sustrato oxidable necesario para el revelado de la reacción de lectura es ácido 5-aminosalicílico al 0,1%, la sal de fosfato disódico a una concentración de 0,1 M, a un pH entre 7,5 y 8,0, para reducir la autooxidación de dicho sustrato;
- d) el sustrato oxidante necesario para el revelado de la reacción de lectura es peróxido de hidrógeno o peróxido de urea, preferiblemente peróxido de urea al 0,05%, en una solución de tampón fosfato-citrato con una concentración de 50 mM a pH 6,0;
- e) en la composición de parada para la reacción de lectura, el ácido fuerte es ácido clorhídrico 5 M o ácido sulfúrico 1 M y la base fuerte es hidróxido sódico 3 M;
- f) en la composición para lavar las partículas inmunomagnéticas, el agente de bloqueo es seroalbúmina bovina al 0,1%, el tensioactivo es monolaurato de sorbitán al 0,02% y el agente bacteriostático es timerosal al 0,01% en una solución de tampón fosfato con una concentración de 25 mM a pH 7,0.
15. Uso de un dispositivo de análisis manual reutilizable para llevar a cabo el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende un soporte (1) que contiene una base (2) y dos planos inclinados laterales (3); un eje móvil (4) que soporta un imán (5) y permite su desplazamiento con respecto al soporte; al menos una sujeción en forma de pinza (7), y al menos una cubeta (6) que descansa sobre la base y está fijada en su posición por la sujeción en forma de pinza (7) según la figura 1.
16. Uso del dispositivo manual según la reivindicación 15 para la realización del análisis *in situ*.
17. Uso de un biosensor automatizado para llevar a cabo el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 10 en de una manera automatizada, según la figura 2, para medir un blanco que comprende una solución libre del microorganismo de interés y una medición del microorganismo de interés en la muestra, **caracterizado por que** consiste en un sistema integrado que comprende
- un primer compartimento con dispositivos termostáticos (A) que comprende:
 - i. un circuito hidráulico para manejar los diferentes líquidos,
 - ii. bombas peristálticas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10),
 - iii. reservorios (13, 14, 15, 19, 20, 21) para almacenar diferentes composiciones, y
 - iv. dispositivos de agitación (16),
 - un segundo compartimento con dispositivos termostáticos (B) localizados dentro del primer compartimento (A), que comprende:
 - i. celdas para la reacción de captura y marcaje del microorganismo de interés,
 - ii. dispositivos de agitación (17),
 - iii. dispositivos de retención magnética (12), y
 - iv. un circuito hidráulico, una extensión del circuito hidráulico del primer compartimento (A), que conecta las celdas de reacción (11) con dicho primer compartimento (A),
 - una celda de lectura para leer la absorbancia a la longitud de onda seleccionada o la fluorescencia a la longitud de emisión seleccionada, alojada en un transductor óptico que, en el caso de *Legionella*, consiste en un espectrofotómetro o un espectrofluorómetro,
 - un microprocesador para el control secuencial del análisis y la adquisición de la señal,
 - un ordenador para procesar datos y su comunicación con el microprocesador,
 - al menos un punto de muestreo, y
 - al menos un punto de salida de residuos.
18. Uso de un biosensor según la reivindicación 17, **caracterizado por que** cada ciclo de medición comprende el análisis de un blanco y el análisis de una muestra, siendo el valor de absorbancia resultante la consecuencia de restar la señal del blanco a la señal de la muestra.

19. Uso del biosensor automatizado según las reivindicaciones 17-18, para la monitorización on-line de la concentración de un microorganismo en agua, basado en usar alícuotas desechables de partículas inmunomagnéticas para la captura de dicho microorganismo.

5 20. Uso del biosensor según la reivindicación 19, **caracterizado por que** dicho microorganismo es *Legionella* y/o *Salmonella* y/o *Escherichia coli* y/o *Listeria* y/o *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* y/o *Brettanomyces*.

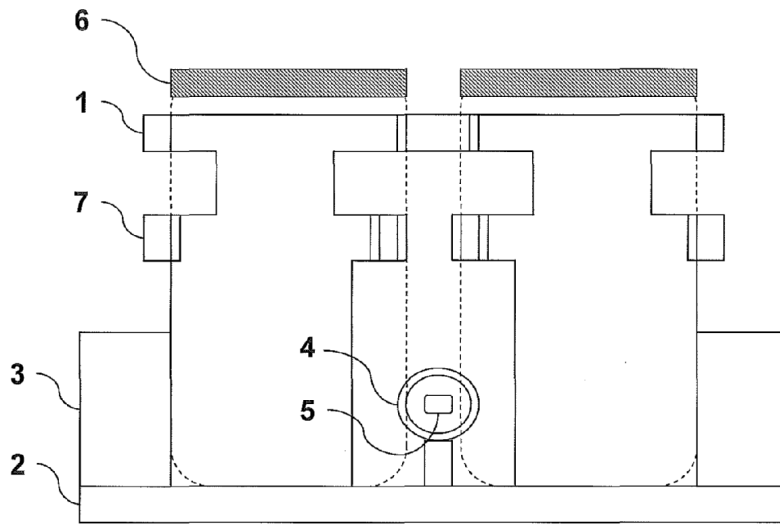


FIG. 1

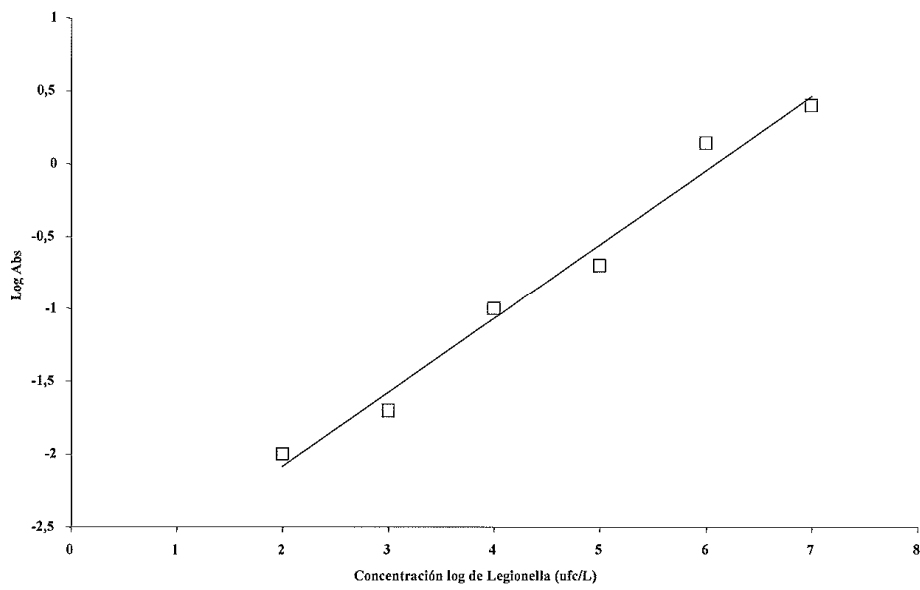


FIG. 2

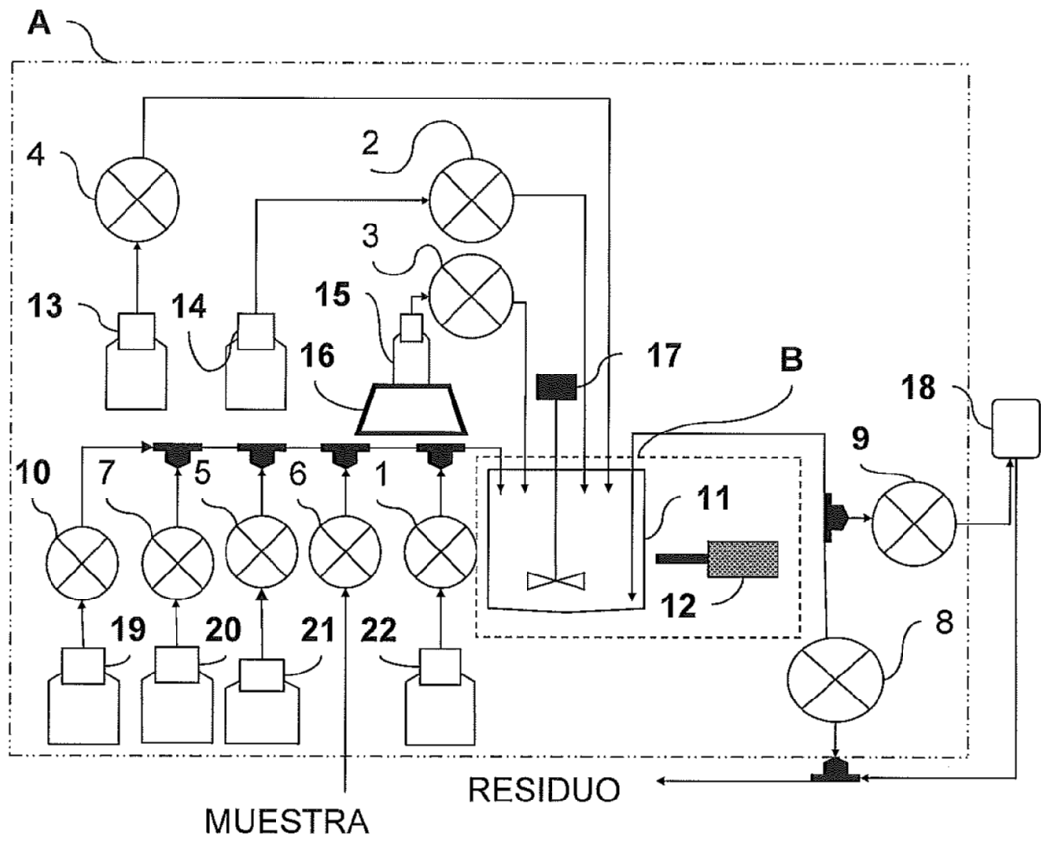


FIG.3

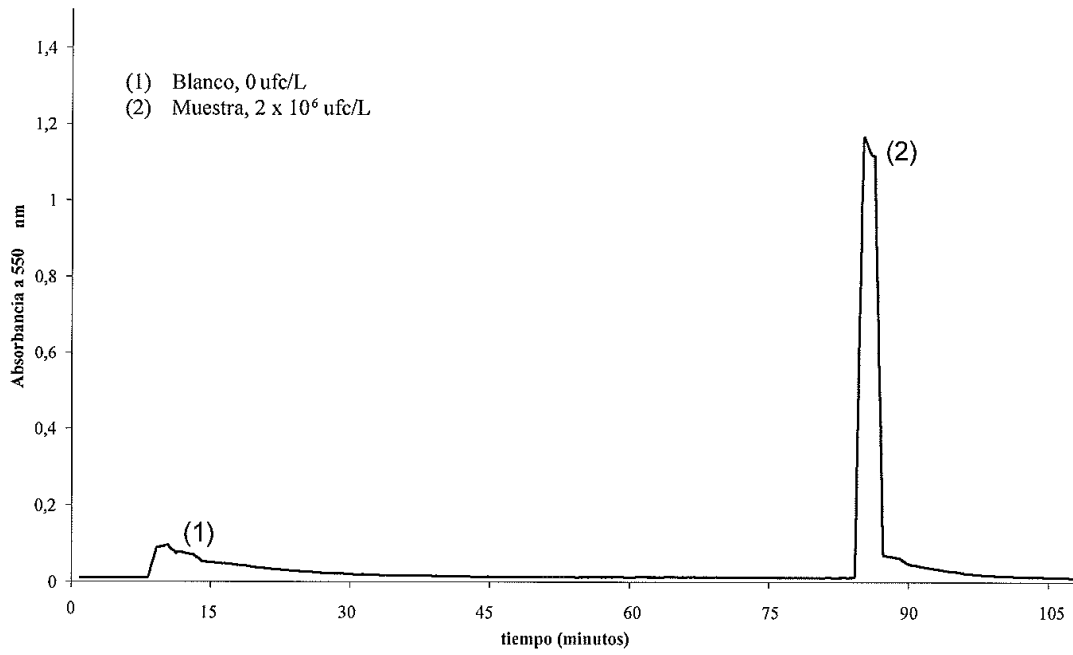


FIG. 4

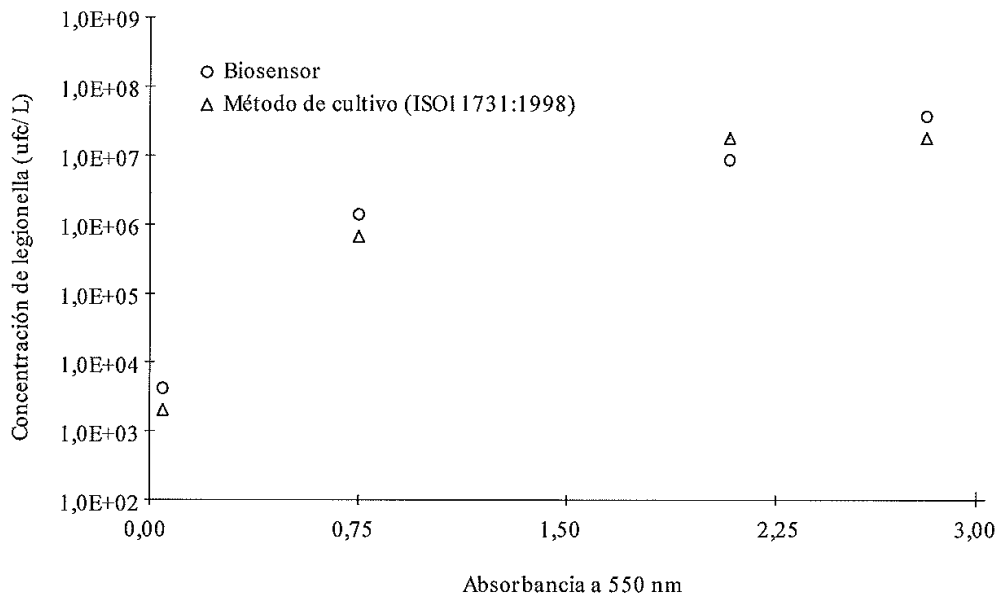


FIG. 5

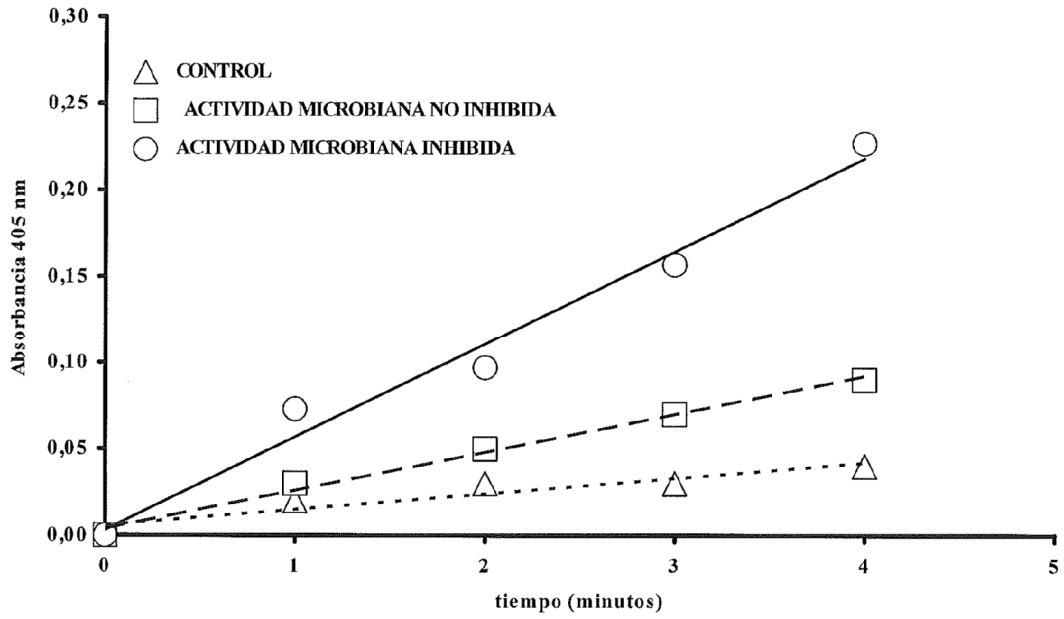


FIG.6

FIG. 7

| Absorbancia 550 nm | Concentración de Legionella (ufc/L) |
|--------------------|-------------------------------------|
| menos de 0,04 | menos de 10^3 |
| 0,04 - 0,07 | 10^3 |
| 0,07 - 0,20 | 10^4 |
| 0,20 - 0,60 | 10^5 |
| 0,60 - 1,90 | 10^6 |
| más de 1,90 | más de 10^6 |

FIG. 8

| Valor de cultivo (ufc/L) ¹ | Resultado cuantitativo (ufc/L) ² | Resultado cualitativo (+/-) ³ |
|--|--|---|
| 0 | 0 | - |
| 2,0 x 10 ² | 0 | - |
| 2,9 x 10 ³ | 3,7 x 10 ³ | + |
| 1,9 x 10 ⁴ | 3,6 x 10 ⁴ | + |
| 5,0 x 10 ⁵ | 6,9 x 10 ⁵ | + |

¹ método ISO 11731:1998 (cultivo en placa) , n = 15.

² método cuantitativo basado en la invención , n = 15.

³ método cualitativo basado en la invención, n = 15.

FIG. 9

| concentración de Escherichia coli (ufc/ml) | Absorbancia 405 nm | |
|--|-----------------------|------|
| | A | B |
| 0 | 0,09 | 0,15 |
| 10 | 0,15 | 0,36 |
| 10 ³ | 0,18 | 0,45 |
| 10 ⁵ | 0,18 | 0,81 |

A polímero de dextrano-aspártico-aldehído
unido covalentemente.

B albúmina de suero bovino adsorbida, manteniendo
su concentración en exceso durante todo el análisis.

FIG. 10

| Efecto protector de la presión de agente bloqueante (albúmina de suero bovino) sobre la partícula magnética, mantenida durante todo el análisis, para atenuar la adsorción no específica de la molécula de lectura . | | | |
|--|------------------------------|---------------------------------|---|
| cinética de la reacción de lectura (Absorbancia a 405 nm) | | | |
| t (min) | bloqueo inicial ^a | bloqueo permanente ^b | reducción de la señal no específica (%) |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,0 |
| 1 | 0,28 | 0,07 | 75,0 |
| 2 | 0,52 | 0,16 | 69,0 |
| 3 | 0,72 | 0,21 | 71,0 |

^a 25 µl de partícula magnética anti E. coli bloqueadas antes de la mezcla con una muestra sin bacteria.

^b 25 µl de partícula magnética anti E. coli bloqueadas antes de la mezcla con una muestra sin bacteria , y con la presión de bloqueante mantenida durante todo el análisis , excepto en la incubación con el anticuerpo conjugado con la molécula de lectura (peroxidasa).

FIG. 11

| Concentración de Legionella (ufc/l) | |
|--|-------------------|
| 0 | 10 ³ |
| 0,07 ^a | 0,13 ^a |
| 0,06 ^b | 0,25 ^b |

^a Una captura^b Tres capturas sucesivas**FIG. 12**

| Absorbancia 550 nm | | |
|----------------------|------|------|
| | A | B |
| Control ¹ | 0,06 | 0,08 |
| Muestra ² | 0,14 | 0,40 |

A etapa de inmunocaptura de 15 minutos

B etapa de inmunocaptura de 16 horas

¹ 0 ufc/l² 10⁴ ufc/l

FIG. 13

| Legionella viva | | Legionella muerta | |
|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| concentración (ufc/l) | absorbancia 550 nm | concentración (ufc/l) | absorbancia 550 nm |
| $1,95 \times 10^5$ | 0,63 | $4,97 \times 10^6$ | 0,0 |
| $5,0 \times 10^4$ | 0,24 | $4,97 \times 10^5$ | 0,0 |
| $1,95 \times 10^4$ | 0,10 | $4,97 \times 10^4$ | 0,0 |
| $5,0 \times 10^3$ | 0,05 | $4,97 \times 10^3$ | 0,0 |

FIG. 14

Concentración de Legionella (ufc/L)

| Origen de la muestra | PCR | Cultivo | Señal |
|-------------------------|------------|------------|-------|
| | 0 | 0 | 0 |
| Torres de refrigeración | $3,93E+06$ | $2,50E+05$ | 0,02 |
| | $2,64E+07$ | $2,50E+06$ | 0,05 |
| | $4,63E+08$ | $2,50E+07$ | 0,21 |
| | 0 | 0 | 0 |
| Aguas residuales | $3,93E+06$ | $2,50E+05$ | 0 |
| | $2,64E+07$ | $2,50E+06$ | 0,03 |
| | $4,63E+08$ | $2,50E+07$ | 0,16 |