

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 757**

21 Número de solicitud: 201830423

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

29.05.2015

30 Prioridad:

30.05.2014 ZA 2014/03971

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.01.2019

62 Número y fecha presentación solicitud inicial:

P 201690063 29.05.2015

71 Solicitantes:

CSIR (100.0%)
Scientia, Meiring Naudé Road, Brummeria
0184 Pretoria ZA

72 Inventor/es:

GOVINDASAMY, Klariska;
POTGIETER, Suretha;
LAND, Kevin y
KUMAR, Shavon

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Método y dispositivo para detección de bacterias enteras**

57 Resumen:

Método y dispositivo para detección de bacterias enteras.

La presente invención proporciona dispositivos de flujo lateral, dispositivos microfluídicos y métodos para detectar bacterias enteras en una muestra de agua. Los dispositivos y métodos proporcionan la detección rápida in situ de bacterias enteras en una muestra de agua.

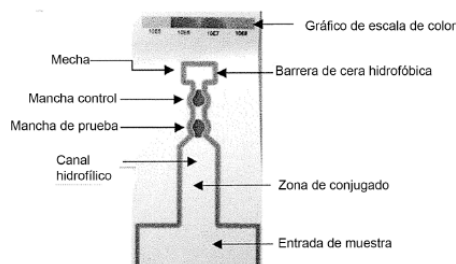


Figura 7

DESCRIPCIÓN

Método y dispositivo para detección de bacterias enteras

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo diagnóstico inmediato para detectar bacterias enteras en una fuente de agua, un método para detectar bacterias enteras de una fuente de agua con el uso del dispositivo y un método para hacer el dispositivo.

10

Según el World Health Report (OMS, 2002), 3,4 millones de personas mueren cada año por causas relacionadas con el agua, saneamiento, e higiene, el 99% de las cuales se produce en el mundo en desarrollo. El contaminante causante de enfermedad más común encontrado en suministros de agua es la bacteria fecal *E. coli*, aunque otras bacterias patógenas, tal como *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas*, también se encuentran comúnmente. Como resultado de la contaminación por aguas residuales, o debido a la desinfección inadecuada en plantas de tratamiento de aguas residuales, estas bacterias patógenas entran en nuestros suministros de agua y alimentos. Cuando se consumen, estas bacterias pueden producir varias enfermedades que incluyen diarrea, infecciones del aparato urinario, y meningitis.

20

En particular, la presencia de *E. coli* se ha usado durante muchos años para indicar la calidad microbiana de los suministros de agua. Como resultado, los suministradores del servicio de agua y autoridades del servicio de agua controlan regularmente la presencia de esta bacteria en los suministros de agua. Cuando se trata de forma apropiada, debe haber de poca a ninguna *E. coli* en el agua. Los niveles aceptables de esta bacteria en el agua potable es 0 unidades formadoras de colonias (ufc) en 100 ml (SANS 241 2011, OMS, 2011), y 1000 ufc en 100 ml de agua residual tratada (Tshwane Water, Sudáfrica).

25

Los métodos de detección convencionales para bacterias patógenas de transmisión hídrica incluyen filtración en membrana y fermentación en tubo múltiple (Rompre *et al.* 2002) y requieren un periodo de enriquecimiento de 24-48 horas. Este tiempo de detección prolongado deja a los usuarios del agua expuestos a suministros de agua potencialmente dañinos, y a los usuarios con frecuencia solo se les notifica sobre la contaminación cuando ya es demasiado tarde. Además, se requieren instalaciones de laboratorio y microbiólogos entrenados para realizar estas pruebas, que son caras y con frecuencia están confinadas a

35

laboratorios urbanos, lo que requiere el transporte de las muestras al laboratorio, que hace que el ensayo de las fuentes de agua en áreas remotas solo se produzca raramente.

Los expertos en la materia conocen bien los dispositivos de flujo lateral tradicionales. Hasta la fecha, estos dispositivos se han usado para detectar, entre otros, bacterias patógenas y toxinas, virus infecciosos, fármacos y pesticidas. Sin embargo, para aplicar los anticuerpos usados para la detección en la tira de prueba de flujo lateral de una manera fiable, reproducible, se requieren máquinas muy caras, que dispensan volúmenes bajos. Como resultado, muchos grupos de investigación con experiencia en sensores biológicos, pero con financiación limitada, no pueden profundizar fácilmente en el desarrollo de medios diagnósticos basados en flujo lateral de bajo coste. Esto afecta la velocidad a la que se desarrollan medios diagnósticos que salvan vidas. Para facilitar la detección usando sustratos de papel para investigación y desarrollo en áreas con baja financiación, los dispositivos microfluídicos basados en papel pueden ofrecer una solución. Estos no utilizan varios papeles especializados (como membranas y almohadillas de conjugado). Se fabrican usando una única pieza de papel (habitualmente papel de cromatografía), y o bien se cortan en un patrón específico o utilizan barreras hidrofóbicas para guiar la muestra hacia las zonas de detección. Estas zonas están precargadas con reactivos de detección que se aplican en el sitio usando una pipeta. Como resultado, estos sensores no necesitan máquinas de dispensar caras para la fabricación, y puesto que una única pieza de papel forma el dispositivo en vez de tres o cuatro, la fabricación se hace más fácil.

Sin embargo, se ha realizado poco trabajo para caracterizar y entender la interacción entre papel de cromatografía, el papel comúnmente usado para la construcción del dispositivo, y los reactivos biológicos o químicos usados para la detección en el dispositivo. Por tanto, se sabe poco sobre el efecto que tiene el papel de cromatografía sobre la sensibilidad del dispositivo. Por otra parte, las membranas de nitrocelulosa, el tipo más común de papel usado en pruebas de flujo lateral, se han caracterizado bien.

Por tanto, el solicitante empezó con el desarrollo de una prueba de flujo lateral tradicional primero y calibró el rendimiento del mecanismo de detección en esta plataforma mejor establecida, antes de aplicarla a un dispositivo microfluídico basado en papel. De esta manera, cualquier cambio en términos de capacidades sensoras debido al uso de papel de cromatografía más que membranas especializadas, se podría identificar inmediatamente. Actualmente no existe un verdadero método de bajo coste para la fabricación de pruebas de flujo lateral. Sin embargo, el solicitante ha demostrado que más que requerir el uso de

equipo caro para depositar líneas de reactivo en el sustrato de prueba, como se realiza tradicionalmente, se puede usar simplemente una pipeta para depositar manchas de reactivo.

- 5 Los investigadores trabajando con recursos limitados pueden, por tanto, usar dispositivos de flujo lateral de esta manera para demostrar la prueba de concepto de una manera de bajo coste. Además, los investigadores en el campo de microfluidos basados en papel pueden usar esta técnica para el desarrollo inicial y optimización de mecanismos sensores antes de transferir la metodología a un dispositivo microfluídico basado en papel. De esta manera, cualquier problema que surja durante el desarrollo del dispositivo microfluídico basado en papel se puede atribuir inmediatamente al papel o al nuevo formato de sensor mismo, ya que el mecanismo de detección ya se ha demostrado operacional.

La presente invención describe el desarrollo y optimización de una prueba de flujo lateral para la detección de *E. coli* en fuentes de agua y su incorporación de la prueba de flujo lateral optimizada y bien caracterizada en un dispositivo microfluídico basado en papel. El mecanismo sensor del sistema de prueba (basado en tecnología de inmunoensayo) se optimizó primero en la prueba de flujo lateral, y solo después se transfirió al dispositivo microfluídico basado en papel debido que era una plataforma de prueba bien establecida y mejor entendida. En contraste con los dispositivos microfluídicos basados en papel, las pruebas de flujo lateral se construyen usando tipos de papel especialmente desarrollados para fomentar la función de inmunoensayo, transferencia de analito, etc. Como resultado, estos tipos de papel permitirán la optimización del mecanismo sensor sin ninguna influencia negativa del papel mismo. Los dispositivos microfluídicos basados en papel, por otra parte, hacen uso de tipos de papel menos especializados, de menores costes, tal como papel de cromatografía. Estos tipos de papeles son más robustos, son menos sensibles a condiciones medioambientales, y pueden resistir los procesos de impresión y calentamiento usados durante la fabricación de dispositivos microfluídicos basados en papel. Como estos tipos de papeles no están diseñados para fomentar la funcionalidad de inmunoensayo, pueden influir en el mecanismo sensor de una manera negativa. Sin embargo, el rendimiento óptimo del mecanismo sensor, determinado usando el formato de prueba de flujo lateral, servirá como una directriz sobre cómo debe rendir el dispositivo microfluídico basado en papel. Si el cambio influye negativamente en los sistemas sensores, la razón podría deberse casi exclusivamente al cambio en el tipo de papel, ya que no hicieron otros cambios al sistema sensor. Como resultado, se puede tomar pasos para superar esto y restablecer el rendimiento del sensor al obtenido en la prueba de flujo lateral optimizada.

Existen varias técnicas de fabricación de dispositivos microfluídicos basados en papel. Estas incluyen fotolitografía, trazado con polidimetilsiloxano (PDMS), impresión en cera, corte láser y grabado con plasma e inyección de tinta (Dungchai et al. 2011). La técnica de fotolitografía, mientras que es cara, crea dispositivos de alta resolución. Este método requiere el uso de instalaciones de salas limpias que incluyen fuentes de luz UV, fotorresistores caros y plasma de oxígeno. La técnica de fabricación de PDMS hace uso de un trazador de escritorio estándar para depositar gotitas de PDMS en papel en un patrón deseado. Es menos caro que la fotolitografía, pero tiene una resolución menor. Produce dispositivos que son flexibles, un requisito importante ya que estos dispositivos con frecuencia están expuestos a tensiones mecánicas tal como flexión y plegamiento. La impresión en cera usa una impresora de tinta sólida que deposita cera en la superficie del papel. La cera se funde después en la profundidad del papel usando una placa calefactora o un horno. El tiempo total de fabricación es menor de 5 minutos y no requiere el uso de solventes orgánicos o cualquier pretratamiento del papel. Una impresora de cera sólida, aunque cara, es capaz de fabricar dispositivos a aproximadamente 0,001\$ por dispositivo, que es menos caro que todas las otras técnicas mencionadas. Esta técnica de impresión también se aumenta a escala más fácilmente para la producción en masa comparada con los otros procesos. Se prevé que la producción a gran escala sea similar a las técnicas de imprimir periódicos. La cera también es más ecológica, fácilmente disponible y estable a altas temperaturas (60°C), temperaturas que son comunes en países en desarrollo. La resolución de los dispositivos impresos con cera es típicamente menor que los otros métodos de fabricación, y esto es debido al paso de fusión requerido en el proceso. Otros grupos han desarrollado métodos de serigrafía para eliminar la necesidad para una impresora de tinta sólida cara. Sin embargo, el aumento a escala de tal técnica de producción se ha demostrado difícil.

Los solicitantes exploraron el uso de la técnica de fabricación de impresión en cera para crear un dispositivo microfluídico basado en papel para la detección de *E. coli* en agua. Se investigaron los parámetros de fabricación óptimos, tal como como los tiempos de fusión de la cera óptimos, las temperaturas de fusión y espesor óptimo de la línea. Hasta la fecha solo se han encontrado unos pocos estudios que describen el tiempo de fusión óptimo y temperaturas de fusión, así como la fuente de calor óptima.

Por último, se creó un dispositivo microfluídico basado en papel usando todos los parámetros óptimos determinados en los estudios anteriormente mencionados. Este

dispositivo se combinó después con el mecanismo sensor de inmunoensayo optimizado en los ejemplos 1 y 2, para crear un sensor de *E. coli* de bajo coste.

Hossain *et al.* (2012) desarrollaron un sensor de papel para detectar *E. coli* y coliformes en agua recreacional. Este dispositivo se fabricó cortando papel de cromatografía Whatman no. 1 en tiras de prueba individuales y cargándolas con reactivos sensores. No se usó la técnica de impresión en cera. Como resultado, el movimiento de fluido hacia las zonas de detección se controló puramente por la forma y dimensiones de la tira de prueba. Para aplicar la prueba al análisis de agua potable (donde se debe detectar tan poco como 1 ufc/100 ml), se usó un paso combinado de separación inmunomagnética (IMS) y cultivo de 8 horas. Como se emplea tecnología enzima-sustrato en el sensor, también se requiere la lisis química de la muestra. Debido a estos requisitos de preparación de la muestra especializados, el sensor no se puede emplear en el campo por trabajadores semicualificados, y el coste de la prueba sube, negando el beneficio de usar sustrato de papel de bajo coste. Además, la IMS contribuye significativamente al coste, de modo que es vital identificar otros medios de preconcentración para reducir el coste de la prueba.

Jokerst *et al.* (2011) desarrollaron una prueba colorimétrica basada en papel que utiliza tecnología enzima-sustrato para detectar patógenos microbianos en muestras de alimentos. El dispositivo se fabricó imprimiendo y después fundiendo círculos de cera en papel de cromatografía Whatman no. 1. Estos círculos sirven como los pocillos en esta placa similar a ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) basado en papel, a los que los reactivos y muestra se tienen que añadir manualmente para que se produzca la detección. Como resultado, el dispositivo no permite la administración autónoma de la muestra en las zonas de detección, como el dispositivo que se desarrolla en este artículo. Para detectar *E. coli*, el sensor desarrollado por Jokerst *et al* se dirige a B-galactosidasa, la enzima común a todas las coliformes y por tanto *E. coli*. Dirigiéndose a esta enzima, el sensor detectará todas las coliformes en una muestra, y por tanto no se puede considerar un sensor selectivo de *E. coli*. Puesto que se dirige a una enzima, se requiere además lisis bacteriana antes del análisis. Para detectar bajos números de *E. coli* (10 ufc), se requiere un periodo de enriquecimiento de 12 horas. Como el autor fue incapaz de mostrar la detección de una única *E. coli*, el dispositivo no se puede usar para análisis de agua potable. El sensor se estructura como una placa de ELISA, de modo que la muestra y los reactivos se deben añadir en las zonas de detección manualmente. Como resultado, el sensor solo se puede usar por personal de laboratorio entrenado. Debido a la necesidad de lisis, enriquecimiento,

y adición manual de reactivos, el sensor se vuelve inadecuado para uso en el campo por trabajadores no cualificados.

5 Por tanto, un dispositivo de prueba diagnóstica inmediato, sencillo que se pueda usar en la fuente de agua, negando la necesidad para el transporte de muestras y pruebas de laboratorio por personal cualificado sería muy beneficioso.

Compendio de la invención

10 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo diagnóstico inmediato para la detección de bacterias enteras en una muestra fluida, en particular una muestra de agua.

15 El dispositivo diagnóstico inmediato puede ser un sensor de flujo lateral o dispositivo microfluídico basado en papel.

El dispositivo diagnóstico inmediato puede comprender además uno o más anticuerpos policlonales específicos para detectar una especie de bacterias enteras.

20 Las bacterias enteras se pueden seleccionar del grupo Enterobacteriaceae, que comprende una cualquiera o más de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* (*E. coli*) sp. o *Pseudomonas* sp.). Preferiblemente, las bacterias enteras son *E. coli* sp.

25 Preferiblemente, la especie de bacterias enteras comprende múltiples cepas de bacterias en esta especie.

30 El uno o más anticuerpos policlonales específicos para las bacterias enteras pueden ser un anticuerpo de captura (Ac). El uno o más anticuerpos policlonales puede ser un anticuerpo de detección. Preferiblemente, el uno o más anticuerpos policlonales son tanto un anticuerpo de captura como uno de detección. Los anticuerpos policlonales de captura y detección pueden ser el mismo anticuerpo policlonal o diferentes anticuerpos policlonales específicos para las bacterias enteras.

35 El dispositivo diagnóstico inmediato puede comprender además un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo específico para la bacteria entera. El anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de captura. El anticuerpo monoclonal o

fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de detección. Por ejemplo, donde el anticuerpo policlonal es un anticuerpo de captura, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de detección. Alternativamente, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de detección, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de captura.

Típicamente, el anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de detección está marcado con una molécula indicadora.

La molécula indicadora puede ser cualquiera de un indicador cromatográfico, óptico, fluorescente, basado en transferencia de electrones, radiomarcado u otro conocido para los expertos en la materia. Preferiblemente la partícula indicadora es una nanopartícula de oro.

El dispositivo diagnóstico inmediato puede comprender además un anticuerpo control. El anticuerpo control puede ser un anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo control puede ser un anticuerpo contra el anticuerpo de detección.

Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento $F(ab')_2$, fragmento Fab o fragmento Fab quimérico (cFab).

Típicamente, el dispositivo de flujo lateral comprende:

- (i) una almohadilla de muestra, para cargar la muestra de prueba fluida;
- (ii) una almohadilla de conjugado, que comprende un anticuerpo de detección policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo, en donde el anticuerpo de detección o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno O y/o K en la superficie de la bacteria entera, en donde el anticuerpo de detección está marcado con una molécula indicadora;
- (iii) una membrana de prueba, que tiene dos regiones, en donde la primera región comprende un anticuerpo de captura policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo en donde el anticuerpo de captura o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno O y/o K en la superficie de la bacteria entera marcada con el anticuerpo de detección y en donde la segunda región comprende un anticuerpo control policlonal o monoclonal o fragmento específico para la detección del anticuerpo de detección; y

(iv) una mecha absorbente,

en donde las cuatro secciones solapantes están en conexión fluida entre sí;

en donde si la almohadilla de conjugado comprende un anticuerpo policlonal, la membrana de prueba puede comprender un anticuerpo policlonal diferente o igual, y en donde si la almohadilla de conjugado comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento, la membrana de prueba comprende un anticuerpo policlonal y si la membrana de prueba comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento, la almohadilla de conjugado comprende un anticuerpo policlonal.

10 Por ejemplo, la almohadilla de conjugado puede ser una membrana de fibra de vidrio, o cualquier otra almohadilla de conjugado adecuada que conozcan los expertos en la materia. Por ejemplo, la membrana de prueba puede ser una membrana de nitrocelulosa conocida para los expertos en la materia.

15 Preferiblemente, la membrana de prueba comprende además el anticuerpo control.

Típicamente, el dispositivo microfluídico basado en papel comprende:

(i) un sustrato de papel; y

20 (ii) un conducto microfluídico definido por una barrera hidrofóbica en el sustrato de papel,

en donde el conducto microfluídico comprende una zona de entrada de la muestra, una zona de conjugado, una zona de prueba y una mecha;

en donde la zona de conjugado, comprende un anticuerpo de detección policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo y en donde el anticuerpo de detección o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno O y/o K en la superficie de la bacteria entera, en donde el anticuerpo de detección está marcado con una molécula indicadora; y

en donde la zona de prueba comprende una primera región comprende un anticuerpo de captura policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo, y en donde el anticuerpo de captura o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno O y/o K en la superficie del anticuerpo de detección-bacteria entera marcada y una segunda región que comprende un anticuerpo control policlonal o monoclonal o fragmento específico para la detección del anticuerpo de detección. El uno o más anticuerpos policlonales pueden ser un anticuerpo de captura o un anticuerpo de detección. Por ejemplo, el anticuerpo de captura policlonal puede ser el mismo o un anticuerpo policlonal diferente al anticuerpo de detección policlonal.

El conducto microfluídico se puede definir por un margen de cera fundida que forma una barrera de cera hidrofóbica que penetra la sección transversal del sustrato de papel.

5 El sustrato de papel puede ser un papel de cromatografía. Por ejemplo, el sustrato de papel puede ser papel de cromatografía Whatman no. 1.

La zona de prueba del dispositivo puede comprender además un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo contra la bacteria entera. El anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de captura. El anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de detección. Por ejemplo, donde el anticuerpo policlonal es un anticuerpo de captura, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de detección. Alternativamente, donde el anticuerpo policlonal es un anticuerpo de detección, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de captura.

15 Preferiblemente, el área de prueba del dispositivo comprende el anticuerpo control.

En particular, el conducto microfluídico puede definir una pluralidad de zonas en el área de prueba. Por ejemplo, el área de prueba puede comprender una zona de entrada de la muestra, una zona de detección y una zona de mecha en comunicación fluida en el área de prueba. Preferiblemente, la zona de detección comprende una zona de prueba y una zona control. Más preferiblemente, la zona de entrada de la muestra está en comunicación fluida con una zona de conjugado que está además en comunicación fluida con la zona de detección.

25 En particular, el conducto microfluídico se puede definir por un margen de cera impreso que tiene una anchura de entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 1000 μm . Preferiblemente, el margen de cera impreso tiene una anchura de aproximadamente 500 μm .

30 El dispositivo microfluídico basado en papel o dispositivo de flujo lateral puede comprender además una escala de calibración para la cuantificación de resultados colorimétricos impresa en el sustrato de papel.

La presencia de una señal positiva en el dispositivo de flujo lateral o dispositivo microfluídico de una muestra fluida que se ha precultivado en un caldo nutriente durante entre 5 y 6 horas es indicativa de que la muestra fluida contiene 9000 ufc o menos de la bacteria entera.

- 5 Similarmente, la presencia de una señal positiva de una muestra fluida que se ha precultivado en un caldo nutriente durante 15 horas es indicativa de que la muestra fluida contiene entre 1 y 9 ufc de la bacteria entera.

- 10 Según una forma de realización adicional de la invención, se proporciona un método de detectar bacterias enteras en una muestra fluida con el uso del dispositivo diagnóstico inmediato de la invención.

El dispositivo diagnóstico inmediato puede ser un sensor de flujo lateral o un dispositivo microfluídico basado en papel.

- 15 El método puede comprender un paso de poner en contacto uno o más anticuerpos policlonales específicos para una especie de bacterias enteras que se va a detectar con las bacterias enteras.

- 20 Las bacterias enteras se pueden seleccionar del grupo Enterobacteriaceae, que comprende una cualquiera o más de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* (*E. coli*) sp. o *Pseudomonas* sp. Preferiblemente, las bacterias enteras son *E. coli* sp.

- 25 Preferiblemente, la especie de bacterias enteras comprende múltiples cepas de bacterias en esta especie.

En particular, el método comprende los pasos de:

- (i) cargar una muestra fluida que comprende las bacterias enteras en el dispositivo;
- 30 (ii) poner en contacto las bacterias enteras en la muestra con un anticuerpo de detección policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo para producir la detección de bacterias enteras marcadas con anticuerpo de detección y anticuerpo de detección restante;
- (iii) poner en contacto las bacterias enteras marcadas con anticuerpo de detección en la
- 35 muestra con un anticuerpo de captura policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo en una zona o membrana de prueba del dispositivo; y

(iv) detectar si se produce una señal positiva o no en la zona o membrana de prueba del dispositivo,

en donde si el anticuerpo de detección es un anticuerpo monoclonal o fragmento, el anticuerpo de captura es un anticuerpo policlonal y si el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal o fragmento, el anticuerpo de detección es un anticuerpo policlonal.

Preferiblemente, los anticuerpos de detección y captura son ambos anticuerpos policlonales. Los anticuerpos de detección y captura policlonales pueden ser el mismo o diferentes anticuerpos policlonales.

El método puede comprender además un paso de poner en contacto el anticuerpo de detección restante del paso (ii) con un anticuerpo control en una zona o membrana de prueba del dispositivo, en cuyo caso una señal positiva en la zona de prueba y control del dispositivo indica que la muestra fluida es positiva para las bacterias enteras y una señal negativa en la zona de prueba y señal positiva en la zona control del dispositivo indica que la muestra fluida es negativa para las bacterias enteras.

La señal positiva puede ser una señal cromatográfica, óptica, fluorescente, basada en transferencia de electrones, radiomarcada u otra.

El método puede comprender además un paso de comparar una intensidad de la señal positiva con una escala de calibración para cuantificar de esta manera la cantidad de bacterias presentes en la muestra fluida. Por ejemplo, donde el dispositivo es un dispositivo microfluídico basado en papel la escala de calibración puede estar impresa en el sustrato de papel.

El método puede comprender además un paso de precultivo de las bacterias. Por ejemplo, las bacterias se pueden incubar durante un periodo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 18 horas. El método puede comprender además un paso de cuantificar el número de bacterias enteras en la muestra fluida precultivando la muestra fluida en un caldo nutriente y ensayando la presencia o ausencia de las bacterias enteras en el caldo nutriente durante el periodo de incubación.

La presencia de una señal positiva en el dispositivo de flujo lateral o dispositivo microfluídico cuando se usa el método de la invención de una muestra fluida que se ha precultivado en un

caldo nutriente durante entre 5 y 6 horas es indicativa de que la muestra fluida contiene 9000 ufc o menos de las bacterias enteras.

Similarmente, la presencia de una señal positiva en el dispositivo de flujo lateral o dispositivo microfluídico cuando se usa el método de la invención de una muestra fluida que se ha precultivado en un caldo nutriente durante 15 horas es indicativa de que la muestra fluida contiene entre 1 y 9 ufc de las bacterias enteras.

El método puede comprender además un paso de agitar con vórtex la muestra de bacterias antes de ensayar.

Preferiblemente, cuando se usa un paso de precultivo, el método es capaz de detectar solo bacterias vivas. Por ejemplo, cuando no se usa un paso de precultivo y el nivel de bacterias en la muestra es igual a o mayor que el límite de detección de la prueba, la prueba es capaz de detectar bacterias muertas, vivas y viables, pero no cultivables.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de hacer un dispositivo diagnóstico inmediato de la invención para la detección de bacterias enteras en una muestra fluida.

En una forma de realización, el dispositivo diagnóstico inmediato es un sensor de flujo lateral.

En particular, el método de hacer el dispositivo comprende los siguientes pasos:

(i) proporcionar una almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, membrana de prueba y una mecha absorbente en conexión fluidica entre sí;

(ii) depositar un anticuerpo de detección policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo específico para las bacterias enteras sobre la almohadilla de conjugado;

(iii) depositar un anticuerpo de captura policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo específico para el organismo completo en la membrana de prueba, en donde si el anticuerpo de detección es un anticuerpo monoclonal o fragmento, el anticuerpo de captura es un anticuerpo policlonal y si el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal o fragmento, el anticuerpo de detección es un anticuerpo policlonal.

Preferiblemente, los anticuerpos de detección y captura son ambos anticuerpos policlonales. Los anticuerpos de detección y captura policlonales pueden ser el mismo o diferentes anticuerpos policlonales.

- 5 El dispositivo puede comprender además depositar un anticuerpo control en la membrana de prueba del dispositivo. Por ejemplo, el anticuerpo control puede ser específico para el anticuerpo de detección. El anticuerpo control puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento de anticuerpo.
- 10 El medio de depositar puede ser una pipeta o con el uso de una máquina de franjeado de reactivo automatizada.

En otra forma de realización, el dispositivo diagnóstico inmediato es un dispositivo microfluídico basado en papel.

15

En particular, el método de hacer el dispositivo comprende los siguientes pasos:

- (i) proporcionar un sustrato de papel;
- (ii) definir un conducto microfluídico en el sustrato de papel para dirigir la muestra a
20 través de un área de prueba del dispositivo; y
- (iii) depositar uno o más anticuerpos policlonales específicos para las bacterias enteras en el área de prueba del dispositivo.

- 25 El paso de definir un conducto microfluídico se puede realizar por una técnica de fabricación de un dispositivo microfluídico tal como fotolitografía, trazado de polidimetilsiloxano (PDMS), impresión en cera, inmersión en cera, serigrafía de cera, corte láser, grabado en plasma o inyección de tinta o similares.

- 30 Preferiblemente, el paso de definir un conducto microfluídico se realiza por impresión en cera, seguido por fusión de la cera para formar una barrera de cera hidrofóbica que penetra la sección transversal del sustrato de papel.

El sustrato de papel puede ser papel de cromatografía. Por ejemplo, el sustrato de papel puede ser papel de cromatografía Whatman no. 1.

35

El uno o más anticuerpos policlonales pueden ser un anticuerpo de captura. El uno o más anticuerpos policlonales puede ser un anticuerpo de detección. Preferiblemente, el uno o más anticuerpos policlonales comprende tanto un anticuerpo de captura como uno de detección. El anticuerpo policlonal de captura y detección puede ser el mismo anticuerpo policlonal o diferentes anticuerpos policlonales específicos para las bacterias enteras.

El método puede comprender además un paso de depositar un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo específico para las bacterias enteras en el área de prueba del dispositivo. El anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de captura. El anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de detección. Por ejemplo, donde el anticuerpo policlonal es un anticuerpo de captura, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de detección. Alternativamente, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de detección, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de captura.

Típicamente, el anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de detección está marcado con una molécula indicadora.

La molécula indicadora puede ser cualquiera de un indicador cromatográfico, óptico, fluorescente, basado en transferencia de electrones, radiomarcado u otro conocido para los expertos en la materia. Preferiblemente la partícula indicadora es una nanopartícula de oro.

El método puede comprender además un paso de depositar un anticuerpo control en el área de prueba del dispositivo. El anticuerpo control puede ser un anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo control puede ser un anticuerpo contra el anticuerpo de detección.

Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento $F(ab')_2$, fragmento Fab o fragmento Fab quimérico (cFab).

Típicamente, al menos los anticuerpos de captura y control se depositan en el área de prueba del dispositivo como manchas o los anticuerpos de captura y control se imprimen en el dispositivo. El medio de depositar puede ser una pipeta.

El conducto microfluídico puede definir una pluralidad de zonas en el área de prueba. Por ejemplo, el área de prueba puede comprender una zona de entrada de la muestra, una zona

de detección y una zona de mecha en comunicación fluida en el área de prueba. Preferiblemente, la zona de detección comprende una zona de prueba y una zona control. Más preferiblemente, la zona de entrada de la muestra está en comunicación fluida con una zona de conjugado que está además en comunicación fluida con la zona de detección.

5

El conducto microfluídico cuando se fabrica por impresión en cera se puede definir por un margen de cera impreso que tiene una anchura de entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 1000 μm . Preferiblemente, el margen de cera impreso tiene una anchura de aproximadamente 500 μm .

10

La impresión en cera del conducto microfluídico se puede realizar por cualquier impresora de cera sólida conocida para los expertos en la materia. La fuente de calor para fundir la cera en una barrera de cera hidrofóbica puede ser un horno o una placa calefactora, u otra fuente de calor adecuada conocida para los expertos en la materia. Preferiblemente, la

15

fente de calor es una placa calefactora.

La temperatura de fusión para calentar el margen de cera impresa en la barrera de cera hidrofóbica es entre aproximadamente 100°C hasta aproximadamente 250°C. Preferiblemente, la temperatura de fusión es desde aproximadamente 100°C hasta

20

aproximadamente 200°C. Incluso más preferiblemente, la temperatura de fusión es aproximadamente 200°C. El tiempo de fusión deseado depende de la anchura del margen de cera impresa y la temperatura de fusión, pero típicamente es aproximadamente entre 1 y 2 minutos.

25

El método puede comprender además un paso de imprimir una escala de calibración para la cuantificación de resultados colorimétricos en el sustrato de papel.

Breve descripción de las figuras

30

Ahora se describirán formas de realización no limitantes de la invención a modo de ejemplo solo y con referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: muestra un gráfico de absorbancia que indica la concentración mínima de anticuerpo que estabiliza el conjugado de oro cuando se ensayaron concentraciones de anticuerpo de 0,01 mg/ml a 0,128 mg/ml.

35

Figura 2: muestra el gráfico RGB que se usó para determinar la cantidad de color rojo y púrpura en cada uno de los viales usados para este estudio.

5 **Figura 3:** muestra un gráfico de la concentración óptima de anticuerpo en mancha control basado en la medida del valor de la escala de grises con Image J y coste en rands.

Figura 4: muestra un gráfico de la concentración óptima de anticuerpo en mancha de prueba basado en la medida del valor de la escala de grises con Image J y coste en rands.

10 **Figura 5:** muestra un gráfico del volumen de conjugado óptimo basado en la medida del valor de la escala grises con Image J y coste en rands.

Figura 6: muestra un gráfico de la tendencia a partir de estudios de elución que indica disminución en el recuento de *E. coli* con distancia creciente de la almohadilla de muestra.
15

Figura 7: muestra una ilustración gráfica de un dispositivo microfluídico basado en papel para la detección de *E. coli*.

Figura 8: muestra un gráfico que indica la anchura de línea impresa óptima basado en medida del valor en la escala de grises con Image J.
20

Figura 9: muestra un gráfico de la comparación de la eficacia entre un horno y una placa calefactora en cada anchura de línea basado en medida del valor en la escala de grises con Image J.
25

Figura 10: muestra un gráfico de la temperatura de fusión óptima para cada anchura de línea basado en medida del valor en la escala de grises con Image J.

Figura 11: muestra un gráfico del tiempo de fusión óptimo para cada anchura de línea basado en medida del valor en la escala de grises con Image J.
30

Figura 12: muestra un gráfico que representa el efecto de la temperatura de fusión en la resolución de líneas basado en medida del valor en la escala de grises con Image J, y

35 **Figura 13:** muestra un gráfico que representa el efecto del tiempo de fusión en la resolución de líneas basado en medida del valor en la escala de grises con Image J.

Figura 14: muestra el método usado para análisis de muestras de aguas residuales; a) evaluación de *E. coli* en 100 ml de efluente, b) evaluación de *E. coli* en 1 ml de balsa de sedimentación, c) técnica de agregación usada para crear suspensiones que contienen varios recuentos de bacterias para uso en pruebas de tiempo. Una vez cargadas, todas las placas de Petri son incubadas en un horno a 37°C.

Figura 15: muestra el resultado del análisis de 24 horas del efluente y balsa de sedimentación.

Figura 16: muestra el tiempo requerido para la detección en prueba de flujo lateral basado en recuento de bacterias en muestra (a) el mejor caso, b) el peor caso. PB = tampón fosfato; SP = balsa de sedimentación, E = efluente.

Figura 17: muestra una comparación entre la prueba de Colilert* y la prueba de flujo lateral de la presente invención (ColiSpot). *Colilert se realizó en placas de Petri y se evaluó el cambio de color. No se usaron bandejas Colilert.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora más completamente de aquí en adelante con referencia a las figuras acompañantes, en las que se muestran algunas, pero no todas las formas de realización de la invención.

La invención como se describe no se debe limitar a las formas de realización específicas divulgadas y se pretende que modificaciones y otras formas de realización estén incluidas en el ámbito de la invención. Aunque en el presente documento se emplean términos específicos, se usan en un sentido genérico y descriptivo solo y no para fines de limitación.

Como se usa a lo largo de esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, las formas singulares “un”, “una”, “él” y “la” incluyen la forma plural, a menos que el contexto claramente indique otra cosa.

La terminología y fraseología usadas en el presente documento es para el fin de descripción y no se debe considerar como limitante. El uso de los términos “comprender”, “contener”, “tener” e “incluir” y variaciones de los mismos usados en el presente documento, se

pretende que abarquen los elementos enumerados después de ellos y equivalentes de los mismos, así como elementos adicionales.

La presente invención proporciona un dispositivo diagnóstico inmediato para detectar
5 bacterias enteras en una fuente de agua, un método de detectar bacterias enteras de una fuente de agua con el uso del dispositivo y un método de hacer el dispositivo.

Mientras que los sensores de flujo y basados en papel se han desarrollado para la detección de bacterias tal como *E. coli*, la mayoría de los sensores solo pueden detectar o bien i) una
10 única cepa de la bacteria, ii) las toxinas producidas por la bacteria o iii) ADN de bacteria (Alocilja et al. 2004; Zhao et al. 2010; Nakasone et al. 2006). En particular, estos sensores no son adecuados para análisis en la fuente, por ejemplo, en una fuente de agua, porque i) existen muchas cepas de bacterias en tales fuentes, de modo que detectar meramente una sola cepa es insuficiente, ii) para permitir la velocidad del ensayo, las bacterias enteras se
15 deben detectar para negar la necesidad para la extracción de ADN y toxinas. Además, las pruebas que detectan toxinas solo pueden detectar cepas patógenas de bacterias. Para seguimiento de la calidad del agua, se deben detectar tipos de bacterias tanto patógenas como no patógenas. Como resultado, las pruebas de flujo lateral (LFT) basadas en la detección de toxinas no se pueden aplicar para seguimiento de la calidad del agua. Las LFT
20 que detectan el ADN de bacterias son difíciles de usar en el campo debido a la necesidad de extraer, aislar, y algunas veces incluso purificar el ADN usado para la prueba. Tales técnicas no las pueden usar trabajadores semicualificados de laboratorio o campo.

Los beneficios de la presente invención incluyen la capacidad de detectar la mayoría sino
25 todas las *E. coli* que se producen en fuentes de aguas medioambientales, comparado con la detección de una única cepa de *E. coli* en muestras de alimentos. Se ha desarrollado una prueba de flujo lateral (LFT) para la detección de *E. coli* en agua (MERCK), pero esta LFT solo detecta una cepa de *E. coli* (O157:H7), y requiere 24 horas de precultivo. Por otra parte, la presente invención permite la detección de recuentos bajos de *E. coli* (1 ufc) en menos de
30 15 horas, comparadas con las 18 horas necesarias para el sistema de detección Colilert de *E. coli*, y las 24-48 horas necesarias para el método de filtración en membrana (método de referencia para la detección de *E. coli*). Además, la presente invención proporciona la detección de *E. coli* enteras, sin necesidad de lisar las células.

35 Por tanto, el solicitante ha investigado el desarrollo de un dispositivo diagnóstico inmediato y métodos para la detección de bacterias enteras por medio de reacciones anticuerpo

policlonal-antígeno para capturar y detectar múltiples cepas de bacterias enteras en una fuente fluida. El dispositivo se desarrolló para detectar bacterias enteras consistentes en el grupo Enterobacteriaceae, que comprende una cualquiera o más de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* (*E. coli*) sp. o *Pseudomonas* sp. Preferiblemente, el dispositivo detecta *E. coli*.

En particular, los dispositivos diagnósticos inmediatos desarrollados por el solicitante se dirigen a permitir la detección de bajo coste de bacterias enteras, incluyendo en la fuente, tal como una fuente de agua, de una manera que es más rápida de los que es actualmente alcanzable usando las tecnologías de detección disponibles actuales. Además, con el uso de anticuerpos policlonales sea como el anticuerpo de detección o captura, o ambos, el dispositivo se dirige a la detección de múltiples cepas de las bacterias que se van a detectar, ya que el anticuerpo policlonal puede unir múltiples epítomos. Tal dispositivo permitirá a los trabajadores de campo probar varias fuentes para bacterias y tomar decisiones más deprisa. Esto es especialmente importante durante situaciones de emergencia, como epidemias bacterianas, donde los esfuerzos de descontaminación se deben producir tan rápido como sea posible para prevenir la propagación de la enfermedad.

Preferiblemente, el método indicador es un método indicador visual para asegurar que no requiere instrumentación de lectura adicional y se necesita poco o ningún entrenamiento del usuario para interpretar los resultados de la prueba. En particular, en el caso del dispositivo microfluídico basado en papel, el dispositivo se hace portátil y de bajo coste miniaturizando sus componentes y combinándolos en un sustrato de papel de peso ligero. Esto, combinado con tecnología de lectura de resultados sencilla, hace el dispositivo adecuado para análisis diagnósticos inmediato o de campo.

El término “anticuerpo” incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpo policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos polirreactivos), y fragmentos de anticuerpos. Según esto, el término “anticuerpo” como se usa en esta especificación incluye, pero no está limitado a, cualquier miembro de unión específico, clase de inmunoglobulinas y/o isotipo (por ejemplo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE e IgM) o un fragmento de anticuerpo de los mismos.

Se entiende en la técnica que un anticuerpo es una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que están interconectadas por puentes disulfuro, o una porción de unión a antígeno de las mismas. Una cadena pesada comprende

una región variable de la cadena pesada (VH) y una región constante de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Una cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera (CL). Las regiones variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras comprenden regiones marco (FR) y regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las cuatro FR están relativamente conservadas mientras que las regiones CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) comprenden regiones hipervariables. Las FR y CDR están organizadas desde el extremo NH₂ al extremo COOH como sigue: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Además, las regiones constantes pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores huéspedes.

También se incluyen en la definición de “anticuerpo” anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos generados de un animal transgénico no humano y anticuerpos seleccionados de bibliotecas usando tecnología de enriquecimiento disponibles para los expertos en la materia.

El término “epítipo” como se usa en el presente documento significa cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se puede unir al paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos habitualmente consisten en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tal como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y habitualmente tienen características tridimensionales estructurales específicas, así como características de carga específicas.

Un “fragmento de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, tal como la región de unión al antígeno o variable de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos Fv, fragmentos scFV; diacuerpos; o anticuerpos lineales.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos “Fab” idénticos o fragmentos de unión a antígeno, cada uno con un único de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento de anticuerpos con pepsina da un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y que retiene su capacidad para entrecruzar un antígeno.

El término “Fv” se refiere al fragmento de anticuerpo mínimo que contiene in sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno. Este fragmento contiene un dímero de

un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. El plegamiento de estos dos dominios produce la formación de seis bucles hipervariables (tres bucles cada uno de la cadena H y L) que aportan los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso una única región variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque a una afinidad menor. "Fv monocatenario" ("sFv" o "scFv") son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL unidos en una única cadena polipeptídica. El polipéptido sFv puede comprender además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno.

Los fragmentos "Fab" contienen el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes tienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se producían como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de la bisagra entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos también se conocen en la técnica.

También se incluyen anticuerpos variantes en el ámbito de la invención. Por tanto, también se incluyen variantes de las secuencias enumeradas en la solicitud en el ámbito de la invención. Se pueden obtener variantes adicionales de las secuencias de anticuerpos que tienen afinidad mejorada usando métodos conocidos en la técnica y están incluidos en el ámbito de la invención. Los expertos en la técnica pueden modificar las secuencias de aminoácidos de un polipéptido utilizando métodos recombinantes y/o técnicas de química sintética para la producción de polipéptidos variantes. Por ejemplo, se pueden usar sustituciones de aminoácidos para obtener anticuerpos con afinidad mejorada adicionalmente. Alternativamente, se puede usar la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos para mejorar la eficacia de la traducción en sistemas de expresión para la producción del anticuerpo. Tales secuencias variantes de anticuerpo compartirán el 70% o más (es decir, el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) de identidad de secuencia con las secuencias enumeradas en la solicitud. Tal identidad de

secuencia se calcula con respecto a la longitud completa de la secuencia enumerada en la solicitud.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

5

Ejemplo 1

*Detección de E. coli usando tecnología de flujo lateral y microfluídica basada en papel:
Fabricación de pruebas de flujo lateral de bajo presupuesto*

10

Principio de trabajo

El sensor de flujo lateral prueba de concepto desarrollado consiste en cuatro secciones, cada una de las cuales se prepara en un tipo específico de papel, y se ensamblan juntas en una tarjeta de refuerzo adhesiva. Se crea una conexión fluídica entra cada sección mediante solapamiento, lo que permite el flujo de la muestra hacia las regiones de detección. Las cuatro secciones son la almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, una membrana de prueba de nitrocelulosa y una almohadilla/mecha absorbente. La almohadilla de muestra sirve para absorber y transferir la muestra fluida sobre el dispositivo de prueba. La almohadilla de conjugado (una membrana de fibra de vidrio) se carga con anticuerpos anti-*E. coli* marcados con oro, que se almacenan en un estado deshidratado. La membrana de prueba se carga con dos anticuerpos diferentes. Un anticuerpo anti-*E. coli* forma la línea/mancha de prueba y un anticuerpo específicamente diseñado para detectar el anticuerpo en el conjugado forma la línea/mancha control. La línea/mancha control se usa para indicar si la muestra ha migrado a través de la longitud entera del dispositivo. El fin de la almohadilla o mecha absorbente es ayudar a arrastrar el fluido de muestra a lo largo de la tira de prueba. Se seleccionó el formato de ensayo sándwich para esta prueba ya que el analito (*E. coli*) muestra varios epítomos y por tanto permite la unión de dos anticuerpos en cada *E. coli* simultáneamente. El formato de ensayo sándwich también se presta a cuantificación debido a la relación proporcional que existe entre la concentración de analito en la muestra y la intensidad de color en la línea/mancha de prueba. Cuando se aplica una muestra a la almohadilla de muestra, el líquido migra hacia arriba de la prueba por fuerzas de capilaridad. El analito (*E. coli*) entra en contacto con los anticuerpos de detección en la almohadilla de conjugado, y se “marca” con oro. Sin embargo, no todos los anticuerpos de detección se unen a *E. coli*, y siguen fluyendo sin unirse hacia arriba en la prueba. La *E. coli* marcada es capturada en la línea de prueba, lo que produce el desarrollo de una señal de

prueba roja. Tanto *E. coli* marcada como sin marcar con frecuencia compiten por los sitios de unión en la línea de prueba, y esto algunas veces produce el “efecto gancho”. Los anticuerpos marcados con oro que no han unido *E. coli* pasan sobre la línea/mancha de prueba a la línea/mancha control y se unen. Esto se produce ya que los anticuerpos de la

5 línea/mancha control se generan para dirigirse a los anticuerpos anti-*E. coli* presentes en el conjugado. Esto produce la formación de una señal en la línea control. Por tanto, la presencia de dos líneas/manchas en la prueba indica la presencia de *E. coli* en la muestra, mientras que la formación de solo una línea/mancha control indica la ausencia de *E. coli* en la muestra. Cualquier otra combinación de señal que se forme se considera error.

10

Materiales

Se usó un anticuerpo anti-*E. coli* policlonal de conejo (Thermo Fisher Scientific, EE UU) en el conjugado y se usó un anticuerpo anti-*E. coli* policlonal de conejo (ABD Serotec, RU) en la

15 línea/mancha de prueba. Ambos de estos anticuerpos detectan todos los antígenos “O” y “K” de la bacteria *E. coli*. Se usaron anticuerpos anti-conejo de cabra (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) en la línea/mancha control. Se compró solución de nanopartículas de oro, con un tamaño de partícula de 40 nm y una densidad óptica (DO) de uno de Diagnostic Consulting Network (California, EE UU). Se compró tampón fosfato en polvo de Sigma

20 Aldrich. El polvo se añadió a agua desionizada y se usó a una concentración de 6,92 mg/ml. Se disolvieron copos de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma Aldrich) en tampón fosfato y se usaron a una concentración de 7 mg/ml.

Se compraron casetes de diálisis de Thermo Fisher Scientific y se usaron para dializar los

25 anticuerpos del conjugado en tampón borato (0,67 g/l) durante la noche. Esto se hizo para eliminar el exceso de sal contenido en el tampón de almacenamiento. El anticuerpo dializado se almacenó en alícuotas en un congelador a -18°C hasta usarse. El papel usado para el desarrollo de la prueba de flujo lateral incluía lo siguiente. Para la almohadilla de conjugado y muestra, se usó fibra de vidrio de Millipore GO41. También se usaron una

30 membrana de prueba de nitrocelulosa (HF80HP, GE Health) y una almohadilla absorbente Surewick CFSP. Estos papeles se ensamblaron en una tarjeta de refuerzo con adhesivo de PVC comprado de Kenosha CV (Países Bajos). Se compró una solución de bloqueo de Invitrogen, y se usó para bloquear la membrana de prueba.

La instrumentación usada para este trabajo incluía un centrífuga de mesa Beckman Coulter Microfuge 16, un horno Ecotherm (Modelo 22, Labotec), un pH-metro (Eutech pH6+), un escáner de mesa (HPscanjet 2400) y una cámara digital Canon powershot G-11.

5 Muestras

Las cepas ATCC de bacterias fueron amablemente proporcionadas por Natural Resources and Environment Unit (CSIR, Sudáfrica). Estas bacterias incluían *Escherichia coli* K12, *E. coli* 0157:H7, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y *Acinetobacter*. Las bacterias se cultivaron usando agar nutriente y caldo nutriente, ambos se compraron de Oxoid. *E. coli* 0157:H7 muerta por calor se compró de Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Todas las bacterias anteriores se manejaron en un laboratorio de bioseguridad, en una campana de gases y cerca de una llama. Las muestras se crearon agregando las bacterias en tampón fosfato (PB). Una vez que la suspensión se volvió turbia, su turbidez se comparó con los estándares de McFarland, después de lo cual la absorbancia de la suspensión se determinó usando un espectrofotómetro de UV/VIS (Perkin Elmer). De esta manera, se determinó la concentración de bacterias en la muestra. Se usó la técnica de la dilución en serie para preparar muestras de diferentes recuentos bacterianos.

20 **Métodos**

Preparación de conjugado

Cantidad mínima de anticuerpo requerida para estabilizar las nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro usadas para preparar el conjugado se protegieron con citrato y por tanto mostraron una carga negativa. Cuando están en suspensión, la repulsión electrostática asegura que las nanopartículas de oro permanecen bien dispersas y mantienen una distancia específica entre ellas. Esta dispersión es lo que produce que la solución de oro aparezca roja. Cuando se añade cloruro de sodio a la solución de oro, los iones sodio cargados positivamente son atraídos a las partículas de oro cargadas negativamente. Esto fuerza las nanopartículas de oro adyacentes a agregar, produciendo que las propiedades ópticas de la solución de oro cambien. El color de la solución de oro cambia de rojo a púrpura/azul. Para prevenir tal agregación, las nanopartículas de oro se pueden recubrir con una capa de proteína, tal como con anticuerpos (Ac) o BSA. Estas proteínas actúan como un escudo electrostático, que previene que las nanopartículas

interaccionen con los iones sodio. De esta manera, las proteínas sirven para estabilizar el nanooro en presencia de sal, y previene que se produzca cualquier cambio de color. Usando este fenómeno, se determinó la cantidad mínima de anticuerpo necesaria para estabilizar el oro. Se prepararon soluciones de anticuerpo (Ac) que variaban en concentración desde 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml en 670 µl de tampón fosfato (PB). Los anticuerpos eran anticuerpos anti-*E. coli* de conejo (Thermo Fisher Scientific). Cada solución de Ac se añadió a 3,33 ml de oro. Por tanto, se usó una proporción de volumen de anticuerpo respecto a oro de 1:5. Después de dejar la solución anticuerpo-oro incubar durante 30 minutos, se añadió una solución de sal al 10% (p/v) y la solución se siguió para cualquier cambio de color. Para confirmar los cambios de color observados, se usó espectrofotometría UV/VIS.

Proporción óptima de anticuerpo respecto a oro

Se determinó la proporción óptima de volumen de oro respecto a anticuerpo (Ac) usando una técnica similar que la usada anteriormente. Se añadieron volúmenes variables de oro DO1 a un volumen fijo de anticuerpo. La concentración de anticuerpo en ese volumen fijo se mantuvo constante a la concentración óptima determinada anteriormente. La proporción de volumen de anticuerpo respecto a oro se varió de 1:1 a 1:20. Después de dejar incubar la solución de oro con el anticuerpo durante 30 minutos, se añadió una solución de sal al 10% (p/v) y la solución se siguió para cualquier cambio de color. Para confirmar cualquier cambio de color, se usó Image J (software de análisis de imágenes). Se capturó una imagen de cada solución, después de la adición de sal. Usando Image J, los valores RGB de cada solución se obtuvieron y se representaron juntas. De esta manera, la cantidad de color en cada vial se semicuantificó y usó para determinar el máximo volumen de oro que se podría usar sin producir que la solución Ac-oro se vuelva inestable.

Preparación de la almohadilla de conjugado

Se usó papel de conjugado Millipore GO41 como la almohadilla de conjugado. La almohadilla de conjugado se suministró como tiras que tienen 30 cm de longitud con una anchura de 1 cm. Antes de cargar el conjugado en la almohadilla de conjugado, el papel se bloqueó primero. Se sumerge en solución bloqueante de membrana, se secó con golpecitos usando toallas de papel, y después secada en horno a 37°C durante 1 hora. Bloquear el papel ayuda a prevenir unión no específica de bacterias en el papel y también ayuda a prevenir que el conjugado se fije permanentemente a la almohadilla de conjugado. El conjugado DO 10 se cargó después en la almohadilla de conjugado bloqueada. Cada

prueba contendrá aproximadamente manchas de 6 µl de conjugado. Para guiar el proceso de pipeteo, se usó un marcador para marcar la posición donde se debe cargar el conjugado. Cada tira de almohadilla de conjugado se colocó junto a una regla, para asegurar que las marcas están separadas 1 cm. Las marcas se localizaron en el borde superior o inferior de la tira de papel de conjugado de modo que se pudieron cortar antes de ensamblar la almohadilla de conjugado en las tiras de prueba de flujo lateral. Una vez cargado, el conjugado se secó en el sitio en un horno a 37°C durante 30 minutos. Una vez seca la almohadilla de conjugado estaba lista para ensamblarse en el dispositivo final. Normalmente, se usan máquinas de rociado/rayado caras para cargar el conjugado en la almohadilla de conjugado. Usando el método descrito anteriormente, el conjugado se puede cargar en la almohadilla de conjugado sin el uso de máquinas caras, lo que permite la demostración de prueba de concepto de una manera de bajo coste.

Carga de las manchas de prueba y control

Se depositaron anticuerpos anti-*E. coli* de conejo (ABD Serotec) en la membrana de prueba como el reactivo de señal de prueba. Se usaron anticuerpos anti-conejo de cabra (KPL) como el reactivo de la mancha control.

Los reactivos de señal de prueba y control se cargaron en la membrana de prueba de nitrocelulosa, de modo que cada prueba contiene aproximadamente 1 µl de cada reactivo. Como se hizo con la almohadilla de conjugado, se usaron un marcador y una regla para marcar y guiar la posición de estas manchas en la membrana. Usando la regla, las manchas de prueba horizontalmente adyacentes se separaron 1 cm. Se usó el mismo espaciado para manchas control horizontalmente adyacentes. Las manchas control se colocaron ±1 cm verticalmente encima de las manchas de prueba. Por tanto, la mancha control se localizaba más cerca de la mecha en la tira de prueba de flujo lateral final. Mantener este espaciado de 1 cm entre manchas de prueba horizontalmente adyacentes, manchas control horizontalmente adyacentes y manchas de conjugado horizontalmente adyacentes permite el alineamiento fácil de los tres reactivos en la tarjeta de refuerzo. Esto es especialmente importante cuando las tiras de prueba individuales se cortan manualmente (usando un par de tijeras) y se necesita asegurar que cada tira de prueba contiene los tres reactivos. Cuando se usa una guillotina automatizada para cortar tiras de prueba individuales, la guillotina se puede programar para asegurar que cada tira es 1 cm. Sin embargo, como esta especificación se enfoca en técnicas de fabricación de bajo coste, las marcas o espaciado común entre manchas de reactivos adyacentes es importante. Cuando se usa una máquina

de franjeado o rociado para depositar los tres reactivos, el espaciado de las manchas adyacentes se vuelve irrelevante ya que la almohadilla de conjugado o la membrana de prueba entera contiene reactivo, es decir, no hay huecos o secciones vacías entre ellas. Una vez cargadas en la membrana, las manchas de prueba y control se secan en un horno a 37°C durante 30 minutos.

Como la membrana de prueba de nitrocelulosa es ligera y por tanto fácilmente propensa al daño, primero se colocó en una tarjeta de refuerzo con adhesivo de PVC antes de que se añadieran las manchas de prueba y las manchas control. La prueba de flujo lateral (LFT) entera se ensambla después en esta tarjeta de refuerzo. Una vez los anticuerpos de la mancha control y la mancha de prueba se secaron en la membrana, la membrana se sumergió en una solución de bloqueo, se secó con una toalla y después de ello se secó durante 1 hora en un horno a 37°C. Después de ello la membrana estaba lista para el ensamblaje final.

Ensamblaje y preparación de LFT

Una vez la membrana de prueba y la almohadilla de conjugado están cargadas con sus respectivos reactivos, la LFT se ensambla. La membrana de prueba se aplica a la sección media de la tarjeta de refuerzo. La almohadilla absorbente se coloca en la sección superior de la tarjeta de refuerzo, y solapa con la membrana de prueba en al menos 2 mm. Este solapamiento crea una conexión fluidica entre las varias secciones de la LFT, y asegura que la muestra se arrastra de la almohadilla de muestra a la almohadilla absorbente. La almohadilla de conjugado se coloca de modo que solape con el extremo inferior de la membrana de prueba en al menos 2 mm. Usando las marcas en la almohadilla de conjugado y la membrana de nitrocelulosa, las manchas de conjugado se alinean con las manchas de prueba y control. Por último, la almohadilla de muestra se coloca en la posición inferior de la tarjeta de refuerzo, solapando con el extremo inferior de la almohadilla de conjugado. La tarjeta de prueba entera se corta después en tiras de prueba individuales usando un par de tijeras afiladas. Por tanto, cada LFT contendrá una mancha de prueba, control y conjugado que están bien alineadas entre sí. Hasta la fecha, los inventores han encontrado que el corte manual no tiene efecto significativo en las propiedades de flujo del fluido muestra, de modo que el rendimiento del sensor no está afectado por el corte manual. Como resultado, las guillotinas automáticas, como las máquinas de rayado y rociado, pueden no requerirse durante la fase de desarrollo de prueba de concepto. Estos descubrimientos demuestran que los laboratorios diagnósticos de bajos recursos pueden

desarrollar con éxito pruebas de flujo lateral sin el uso de equipo de fabricación caro. Tal equipo puede requerirse solo durante el desarrollo del prototipo, una vez que hay prueba de concepto. Esto evita inversiones innecesarias antes de que se haya mostrado que el sistema de detección realmente funciona.

5

Carrera de pruebas de flujo lateral

Para probar cada LFT, se transfieren 200 µl de la muestra con adición a un tubo de ensayo de vidrio, en el que la LFT se coloca con su almohadilla de muestra sumergida. Un volumen de 200 µl de muestra demostró suficiente para absorberse a través de la longitud entera de la LFT. Este volumen también asegura que solo la almohadilla de muestra (y no la almohadilla de conjugado) hacen contacto directo con el fluido. La LFT absorbe la muestra, y tarda aproximadamente 10-15 minutos para formar una señal de línea/mancha de control y prueba fuerte.

15

Determinación de la concentración de anticuerpo de mancha control y mancha de prueba óptima

Se hicieron una serie de LFT, cada una de los cuales tenía concentraciones variables de anticuerpo sea en la mancha control o la mancha de prueba. Todos los otros parámetros de fabricación se mantuvieron constantes cuando cualquiera de estas concentraciones se varió. La concentración de la mancha control se varió de 0,2 mg/ml a 1 mg/ml, mientras se mantenía la concentración de la mancha de prueba constante. El fin de esto era identificar cómo influye la concentración del anticuerpo en la intensidad de señal de la mancha control. Para realizar esto, se usaron dos tipos de muestras, una muestra de 10^2 ufc/ml de *E. coli* 0157:H7 muerta por calor y una muestra de tampón fosfato. Para determinar la concentración óptima de anticuerpo de la mancha de prueba, se hicieron una serie de LFT donde la concentración de anticuerpo de la mancha de prueba se varió a 4 mg/ml a 0,5 mg/ml, la concentración de anticuerpo de la mancha control se mantuvo constante. Se usó una muestra de 10^7 ufc/ml de *E. coli* para este estudio. Se siguió el cambio en la intensidad de color de la mancha de prueba en relación a la concentración de anticuerpo de la mancha de prueba.

Se usó el software informático Image J para analizar las intensidades de señal. Image J analiza una imagen capturada y usa análisis en escala de grises para evaluar la intensidad de color de esa imagen. Un valor alto en la escala de grises indica una imagen clara (o

blanca) mientras que un valor bajo en la escala de grises indica una imagen oscura (o negra). Siguiendo el valor en la escala de grises de las señales de la mancha de prueba y control con relación a su concentración de anticuerpo, se pudieron determinar las concentraciones de anticuerpo de la mancha de prueba y control óptimas.

5

Determinación del volumen óptimo de conjugado

Los inventores determinaron después cómo el volumen/cantidad de conjugado usado en una LFT influye en la intensidad de la señal de la mancha de prueba, así como el límite de detección del dispositivo. Se cargaron volúmenes de conjugado que variaban de 1 µl a 10 µl en LFT separadas que se corrieron con una muestra de 10^7 ufc/ml de *E. coli* 0157:H7 muerta por calor. La intensidad de color de la mancha de prueba se siguió tanto visualmente como usando Image J. Para determinar si usar un volumen de conjugado mayor mejoraría el límite de detección de la prueba, se hicieron un conjunto de LFT que contenían 10 µl de conjugado (en lugar de los habituales 6 µl) y se corrieron con concentraciones variables de muestras *E. coli* 0157:H7. Las concentraciones de la muestra variaron desde 10^0 ufc/ml a 10^9 ufc/ml. La menor concentración de muestra que produjo una señal de prueba positiva se considera el límite de detección del dispositivo. El límite de detección obtenido usando 10 µl de conjugado se compara después con el límite de detección obtenido cuando se usan 6 µl de conjugado. De esta manera, se observaría cualquier mejora en el límite de detección de la prueba como resultado directo de un volumen de conjugado aumentado.

20

La influencia de la membrana de prueba en la intensidad de señal

Se colocaron diferentes tipos de membranas en la región de prueba del dispositivo. Se depositaron manchas de prueba y control en cada una de estas membranas. Una vez ensambladas, cada prueba se corrió con muestras de 10^7 ufc/ml de *E. coli* 0157:H7 muerta por calor. El fin era examinar el efecto que diferentes tipos de membrana tienen en la intensidad de color de las manchas de prueba y control, y seleccionar el tipo óptimo.

30

Tabla 1: Membranas de nitrocelulosa usadas en la región de prueba de la LFT

Nombre del papel	Abreviatura
Whatman AE 100	AE100
Whatman FF85	FF85
Sartorius CN 140	CN140

Whatman Fusion Five	F5
Millipore NF240	240
WhatmanImmunopore FP	FP
Whatman Prima 125	125
Whatman FF60/100	FF60
Millipore HF075	075
Whatman AE98	AE98
Vivid 170 Pall nitrocellulose	Pall
Whatman AE 99	AE99
Millipore HF135	135
Millipore HF090	090

Tiempos óptimos de prueba y secado

Los inventores consecuentemente determinaron: a) durante cuánto tiempo se deben correr las pruebas, para determinar la duración del tiempo durante el que las pruebas se deben mantener sumergidas en su muestra; y b) cuánto tiempo después de retirar la LFT de su muestra se deben leer los resultados de la prueba.

Quando las pruebas se retiran de sus muestras y se dejan expuestas a condiciones ambientales durante algún tiempo, el flujo de retorno de la muestra puede influir en la intensidad de la señal, y puede influir en el resultado de la prueba. El flujo de retorno de la muestra se produce cuando la almohadilla de muestra se vuelve más seca que la mecha, lo que fuerza al líquido a migrar de la mecha de vuelta hacia la almohadilla de muestra. Durante tal flujo de retorno, las nanopartículas de oro se pueden depositar de forma no específica en y alrededor de la mancha de prueba, creando una falsa señal positiva. Además, cuando se deja expuesta a condiciones ambientales durante demasiado tiempo, la membrana de prueba se seca y altera el verdadero color de las señales de prueba. Se ha encontrado que la señal cambia de rojo a púrpura. Este cambio en el color e intensidad de la señal puede conducir a mala interpretación de los resultados de la prueba, y se puede volver especialmente problemático cuando se debe determinar una correlación entre intensidades de señal y concentración de la muestra.

Para la investigación del tiempo de secado, las pruebas se dejaron en sus muestras (*E. coli*, 10^7 ufc/ml) para correr durante aproximadamente 15 minutos. Una vez se retiraron de la muestra, las LFT se expusieron a condiciones ambientales. Se tomaron fotos de las pruebas

cada 2 minutos después de que se retiraran de la muestra y usando el software image J, se siguieron para cambios en color e intensidad de la señal.

Para el estudio del tiempo de ensayo, las LFT se dejaron sumergidas en las muestras de *E. coli* (10^7 ufc/ml) y muestras de tampón fosfato y se corrieron entre 30 segundos y 30 minutos. Se examinaron las intensidades de señal tan pronto como las LFT se retiraron de sus muestras. Se examinaron señales de manchas control en esas pruebas corridas con PB solo, mientras que se examinaron señales de manchas de prueba en esas pruebas corridas con muestras ricas en *E. coli*.

Posición de la línea de prueba

El fin de esta investigación era determinar cómo influye la posición vertical de la mancha de prueba en la longitud de la membrana en la potencia de la señal. Se hicieron varias LFT según lo habitual, sin embargo, no se usaron manchas control. Esto es para permitir el movimiento de la posición de la mancha de prueba a lo largo de la longitud entera de la sección de membrana. Se hicieron cuatro dispositivos. La mancha de prueba en cada dispositivo se colocó aproximadamente a 4 mm, 7 mm, 12 mm y 13 mm del borde superior de la almohadilla de conjugado. Se usaron muestras de *E. coli* muertas por calor 10^7 ufc/ml para correr estas pruebas. La diferencia en intensidad de señal entre las varias posiciones de la mancha de prueba se usó para a) determinar si la posición de la mancha de prueba influye en la intensidad de señal, y b) si lo hace, determinar la posición de la mancha de prueba óptima.

El efecto que tiene una concentración aumentada de anticuerpo de mancha de prueba, y un volumen y concentración de conjugado aumentados en el límite de detección

Los inventores determinaron si una concentración aumentada de anticuerpo en la mancha de prueba y conjugado influiría el límite de detección de las LFT. Para examinar la influencia que tendrá una concentración aumentada en la mancha de prueba, se hicieron LFT con una concentración en la mancha de prueba de 4 mg/ml. Esta es la mayor concentración a la que este anticuerpo particular se suministra. Se usaron *E. coli* 0157:H7 a concentraciones que variaban de 10^8 ufc/ml a 10^0 ufc/ml para probar estas LFT. Para determinar el efecto que tendrá una concentración de Ac aumentada en el conjugado, la concentración de los anticuerpos en el conjugado se aumentó a 0,12 mg/ml. Esto es casi 4 veces la cantidad de anticuerpo encontrada suficiente para la estabilización de oro. Estas pruebas se corrieron

con muestras de *E. coli* 0157:H7 muertas con calor que variaban de 10^8 ufc/ml a 10^3 ufc/ml. Para realizar los estudios de volumen aumentado de conjugado, se fabricaron LFT con un volumen de conjugado aumentado de 10 μ l. Esto está muy por encima del volumen de conjugado determinado como óptimo. Las LFT se corrieron con suspensiones de *E. coli* 0157:H7 que variaban en concentración de 10^8 ufc/ml a 10^0 ufc/ml. En ambos estudios de conjugado se espera que como más anticuerpos están disponibles para marcar *E. coli* en la muestra, más *E. coli* marcada se debe capturar en la mancha de prueba. Idealmente, esto debe permitir la detección de *E. coli* a menores concentraciones de muestra. Lo mismo aplica a los estudios de concentración de mancha de prueba aumentada. Puesto que más anticuerpos están disponibles para capturar las bacterias marcadas en la mancha de prueba, el límite de detección de la prueba debe mejorar.

Resultados y Discusión

15 Comentarios generales sobre el proceso de fabricación de bajo coste

Habitualmente las pruebas de flujo lateral tienen líneas de prueba y control y no manchas. Estas líneas se depositan en la membrana de nitrocelulosa usando máquinas de franjeado caras. Como esta invención se enfoca en métodos de fabricación de bajo coste para sensores de papel, se usó una pipeta en lugar de una máquina de franjeado para depositar los anticuerpos de prueba y control. Como resultado, las señales en la LFT tienen una forma circular y, por tanto, se denominan manchas de prueba y control. Mientras que es inhabitual, estas manchas redondeadas aún forman señales fuertes claramente visibles. La visualización de estas señales es todo lo que se necesita para confirmar la funcionalidad de mecanismo sensor y, por tanto, la funcionalidad de la LFT. Como resultado, no se requieren máquinas de franjeado. Para determinar si el uso de manchas en lugar de líneas influye negativamente el rendimiento de las pruebas de flujo lateral, un conjunto de LFT se hicieron externamente, usando máquinas de franjeado del estado de la técnica. El límite de detección de estas pruebas (con líneas) era el mismo que el de las pruebas con manchas. Por tanto, se cree que los dispositivos de flujo lateral se pueden optimizar a un nivel extremo sin tener que comprar máquinas de franjeado. Solo se hace difícil trabajar con las manchas cuando se requiere la cuantificación de las señales. Mientras que las intensidades de señal de la línea y mancha parecen similares a simple vista, la forma en cresta de la señal de la mancha la hace difícil de cuantificar. Esto es debido a la dificultad asociada con seleccionar un área de forma irregular para el análisis de imagen. También se usó una pipeta para cargar el conjugado en la almohadilla de conjugado en una manera de bajo coste.

Normalmente se usa una máquina de rociado para este fin. Usar una pipeta para depositar el conjugado parece no tener efecto en el nivel de conjugado liberado de la almohadilla de conjugado. Queda poco o ningún residuo en la almohadilla de conjugado una vez que se corre la prueba. Para hacer una comparación, las LFT se fabricaron depositando el conjugado usando una máquina de rociado y después evaluando el límite de detección de estas LFT. Las pruebas tenían el mismo límite de detección que las pruebas hechas con manchas de conjugado. Sin embargo, la distribución del conjugado a través de la anchura de la tira de prueba según fluye hacia arriba, se diferenciaba entre las dos. Cuando se usa una pipeta para depositar el conjugado, el conjugado se coloca en el centro de la almohadilla de conjugado. Como resultado, cuando se libera, el conjugado fluye hacia arriba principalmente a lo largo del centro de la anchura de la tira. Para reducir este efecto, el conjugado se puede cargar a lo largo de la anchura entera de la almohadilla de conjugado. No obstante, si la mancha de conjugado está bien alineada con la mancha de prueba y control, este problema se vuelve irrelevante. Por tanto, hacer manchas de conjugado es suficiente durante el desarrollo de la prueba de concepto. En resumen, se cree que las máquinas de franjeado/rociado no son esenciales para fabricar LFT durante la fase de prueba de concepto. Recomendamos que laboratorios de pocos recursos que están desarrollando sensores de papel no necesitan invertir en equipo de rayado/rociado antes de la prueba de concepto. Esto ayuda a reducir el riesgo financiero asociado con el desarrollo de cualquier dispositivo sensor nuevo.

Una de las mayores desventajas asociadas con el uso de manchas de prueba y control es el desarrollo de señales “con forma de cresta”. Habitualmente se esperan manchas completamente redondeadas, sin embargo, las crestas se forman como consecuencia de dos factores. El primero es el efecto anillo de café que experimenta la mancha de prueba durante el proceso de secado. En física, este patrón en anillo lo deja una gotita que contiene partículas una vez el líquido se ha evaporado. El patrón es debido al flujo capilar inducido a través de la gota como resultado de las velocidades de evaporación diferenciales. El líquido que se evapora del borde de una gotita se repone con líquido del interior. Este flujo hacia el borde de la gota lleva las partículas dispersas en la gota a los bordes. En el caso de la mancha de prueba de la LFT, esto implica que la mayoría del anticuerpo se concentra en los bordes exteriores de la mancha.

Otro tipo de flujo inducido dentro de la gotita durante la evaporación se llama flujo de Marangoni. Si el flujo de Marangoni en la gotita es lo suficientemente fuerte, puede ayudar a redistribuir las partículas de vuelta hacia el centro de la gotita. El agua, el principal

constituyente del tampón usado para diluir los anticuerpos de la mancha de prueba y control, tiene un flujo de Marangoni débil, lo que agrava este problema adicionalmente.

El segundo factor está relacionado con el movimiento lateral de las bacterias hacia arriba de la prueba. Según las bacterias se mueven hacia arriba, hacen contacto primero con la región inferior del anillo de café, y se unen. Según más bacterias entran en contacto con esta región, se forma una acumulación de Ac-bacteria-Ac-oro. Cuanto mayor sea la afinidad que tiene el anticuerpo por las bacterias, más rápido y más denso se forma esta acumulación. Según más bacterias alcanzan esta área, o bien se añaden a esta acumulación, o se desvían lejos de la mancha de prueba completamente, moviéndose hacia los márgenes exteriores de la LFT. Como resultado, algunas de las bacterias de la muestra se mueven hacia arriba de la LFT a lo largo de los márgenes del dispositivo, evitando por completo la mancha de prueba. Como resultado, solo se observa una señal en forma de cresta, oscura ya que solo la parte inferior del anillo de café se une a *E. coli* marcada con oro. Una pequeña cantidad de bacteria podría alcanzar otras áreas de la mancha de prueba, aunque a pequeño nivel. Esto es evidente por el aspecto rojo claro de otras regiones en la mancha de prueba. Esta distribución desigual de la señal hace difícil cuantificar las señales en mancha. No obstante, se encontró que efecto anillo de café no previene que la intensidad de color de las crestas muestre una dependencia de los recuentos de *E. coli* en la muestra, la concentración de Ac de las manchas de prueba y control, el volumen de Ac usado, etc. Esta dependencia del color se espera cuando se usa el formato de ensayo sándwich. Para cuantificar estas dependencias y por tanto cuantificar la influencia que diferentes parámetros de fabricación tienen en el rendimiento de la prueba, se usaron medidas en escala de grises de la región más oscura de las manchas de prueba y control. De esta manera, el diseño del sensor de papel se puede optimizar de una manera de bajo coste. Todas las técnicas anteriores permiten el desarrollo de dispositivos de prueba de concepto y optimización significativa del rendimiento de los dispositivos sin tener que hacer grandes inversiones financieras en nuevo equipo.

30 Preparación de conjugado

La cantidad mínima de anticuerpo requerido para estabilizar las nanopartículas de oro

Basado en las reacciones de cambio de color visible, la concentración mínima de anticuerpo que era capaz de estabilizar el oro y mantener su aspecto rojo después de la adición de sal, es 0,03 mg/ml. Esas soluciones agregadas con una concentración de anticuerpo de menos

de 0,03 mg/ml se volvieron púrpuras después de la adición de sal. Esas soluciones de anticuerpo con una concentración por encima de 0,03 mg/ml, sin embargo, se mantuvieron rojas. La espectroscopía de absorbancia confirma esto. Las nanopartículas de oro habitualmente muestran un pico de absorbancia característico entre una longitud de onda de 500 nm y 600 nm. Cuando hay cambios en las propiedades ópticas del oro (tal como cuando se vuelve púrpura debido a la adición de sal), su pico de absorbancia característico desaparece. La figura 1 muestra que los picos de absorbancia de esas curvas con concentraciones de anticuerpo por debajo de 0,03 mg/ml están ausentes. Esto implica que cuando se usaron esas concentraciones de Ac, las soluciones de oro se volvieron púrpura. Solo esas curvas con concentraciones de anticuerpo por encima de o iguales a 0,03 mg/ml retienen su aspecto rojo y por tanto muestran picos de absorbancia. Esto confirma que una concentración de anticuerpo de 0,03 mg/ml es la concentración mínima requerida para estabilizar la solución de oro. Para compensar por cualquier error de pipeteo cuando se crea el conjugado, y para servir como una medida de seguridad, se usará una concentración de anticuerpo de 0,05 mg/ml, ligeramente mayor que la concentración mínima requerida, para desarrollar el conjugado.

Optimización de la proporción de volumen de anticuerpo respecto a oro

La figura 2 muestra el gráfico RGB que se usó para establecer la cantidad de color rojo y púrpura en cada uno de los viales usados para este estudio. Cada vial contenía una cantidad constante de anticuerpo, y volúmenes crecientes de oro. Una vez se añade sal a cada uno de estos viales, solo esas soluciones que son inestables cambian de rojo a púrpura. La figura 2 muestra como usando valores RGB, el cambio de color en cada uno de estos viales se puede cuantificar indicando las intensidades de color rojo, azul y verde prevalentes en cada tubo. En la figura 2, la curva superior indica la intensidad de color rojo en las soluciones, la curva intermedia indica la intensidad del color azul en la solución y la curva inferior indica la intensidad del color verde. Para indicar el desarrollo de cualquier color púrpura en estos viales, las curvas azul y roja solapan entre sí. Basado en la figura 2 proporciones de volumen de anticuerpo respecto a oro entre 1:1 y 1:13 permitirán el desarrollo de conjugados estables. Esto es evidente por la mayor intensidad del color rojo (que azul o verde) a esas proporciones de volumen. Por tanto, la solución de oro mantiene su aspecto rojo de proporciones de volumen de 1:1 a 1:13.

Cuando el volumen de oro en el conjugado aumenta a más de 13x el del anticuerpo, el conjugado se vuelve inestable. Esto es un resultado de haber insuficiente anticuerpo

disponible para unirse completamente a todas las nanopartículas de oro en solución. La proporción de volumen de Ac respecto a oro óptima está donde la curva roja se coloca bien por encima de la curva azul. A proporciones de volumen de 1:13 y mayores, estas dos curvas se cruzan lo que indica se produce un cambio de color a púrpura. A una proporción de volumen Ac-oro de 1:1, las curvas roja y azul están colocadas bien lejos entre sí. Esta distancia se mantiene establemente hasta que se alcanza una proporción de volumen de 1:10.

Entre las proporciones 1:10 y 1:13 las curvas empiezan a acercarse, insinuándose hacia el inicio de inestabilidades en la solución de oro. La proporción de volumen Ac:oro óptima se selecciona, por tanto, como 1:10, ya que usando esta proporción se puede producir la máxima cantidad de conjugado por volumen de anticuerpo, mientras que aún se asegura la estabilidad del conjugado. por tanto, se usará una proporción de volumen de Ac respecto a oro de 1:10 para el desarrollo del conjugado.

Marcaje del anticuerpo

Como se determinó anteriormente, se usó una concentración de anticuerpo de 0,05 mg/ml y una proporción de volumen de anticuerpo respecto a oro de 1:10 para preparar el conjugado. Una vez se añadió el anticuerpo al oro, los dos se pusieron en contacto durante 30 minutos para fomentar el marcaje eficaz del anticuerpo por el oro. Después de 30 minutos, se añadió seroalbúmina bovina (7 mg/ml), en un proceso denominado bloqueo. Se dejó incubar la BSA con la solución oro-Ac en la nevera durante la noche. Durante el proceso de bloqueo la BSA es libre para unirse a cualquier sitio no ocupado en las nanopartículas de oro. Este proceso previene que el oro se una de forma no específica al papel mismo, a los anticuerpos de la línea de prueba o a la *E. coli* en la muestra. El volumen de BSA añadido era igual al volumen de Ac usado, ya que se ha demostrado que esta cantidad es suficiente para este fin. La solución BSA-oro-Ac se centrifugó después a 13000 g durante 15 minutos para separar los anticuerpos marcados y no marcados entre sí. El precipitado (el conjugado) que se obtuvo después de la centrifugación se redispersó en una solución de BSA, pero se redispersó en un volumen que aseguraba un aumento 10x en la concentración de oro. Para hacer esto, el precipitado se resuspendió en un volumen que era aproximadamente 10x menor que el volumen original de oro usado para fabricar el conjugado. Esto aumenta la densidad óptica (DO) del oro de DO 1 a DO 10. Usar un conjugado con una densidad óptica mayor en la prueba producirá señales de prueba que son más oscuras, más fuertes y por tanto más nítidas.

Para asegurar que la concentración de oro está de hecho aumentada de esta manera, se usó un espectrofotómetro de UV/VIS para medir la absorbancia del conjugado antes y después de que aumentara la concentración de oro. La diferencia en la absorbancia entre los dos indica el nivel de concentración. El oro concentrado ($\pm$ DO 10) primero se diluye por un factor de 100 antes de colocarlo en el espectrofotómetro. Como resultado, el valor de absorbancia obtenido se debe multiplicar por 100 para determinar la absorbancia real del oro concentrado. La absorbancia del tampón fosfato y del sobrenadante obtenido después de centrifugar también se midió. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Valores de absorbancia para oro a DO1, DO 10 y el sobrenadante y tampón fosfato

Muestra	Absorbancia
DO 1	1,094
DO 10 (diluido 100x)	0,095
Sobrenadante	0,031
Tampón fosfato	0,0365

El valor de absorbancia del conjugado aumenta desde 1,094 (a DO 1) a 9,5 ($0,095 \times 100$, a DO10). Esto indica un aumento de aproximado de 10x en la densidad óptica del oro. Estos resultados demuestran que redispersando el precipitado de conjugado en un volumen 10x menor, se puede obtener un aumento 10x en la concentración de oro. La absorbancia del sobrenadante (eliminado del tubo después de centrifugar) y la del tampón fosfato simple es la misma. Esto indica que poco o nada de oro se pierde al sobrenadante durante el proceso de centrifugación, y que el oro de hecho se usó en la preparación del conjugado final.

Determinación de la concentración óptima de anticuerpo en la mancha control

Según la figura 3, la intensidad de la señal de la mancha control aumenta según aumenta la concentración de Ac. Esto se observa por el valor en la escala de grises decreciente de las señales con un aumento en la concentración de Ac. A una concentración de 1 mg/ml, la señal es la más nítida y más oscura. Se asume que la intensidad de la señal se puede mejorar más aumentando la concentración de Ac por encima de 1 mg/ml. Sin embargo, en este momento, la máxima concentración a la se suministra el Ac de la mancha control es 1 mg/ml. Como se esperaba, el coste del reactivo de la mancha control y por tanto la LFT sube según aumenta la concentración del anticuerpo en la mancha control. Por debajo de una concentración de 0,6 mg/ml, la señal control es casi invisible a simple vista y por tanto

no se puede usar. Por tanto, aumentar la concentración de la mancha control de 0,2 a 0,6 mg/ml está justificado, independientemente de los 33 céntimos de aumento en el coste de anticuerpo. A una concentración de 0,8 mg/ml, la señal control es nítida y visible. Sin embargo, la intensidad de la señal es menor que la obtenida cuando se usa una concentración de Ac de 1 mg/ml. Esto es evidente por la disminución de 12,2 unidades en el valor de la escala de grises según aumenta la concentración de Ac de 0,8 mg/ml a 1 mg/ml. Un dispositivo fabricado usando una concentración en la mancha control (CS) de 1 mg/ml costará 17 céntimos más que un dispositivo hecho usando una concentración de Ac de 0,8 mg/ml. Considerando el hecho de que el dispositivo final debe costar $\pm R10,00$ (10 rands sudafricanos), usando una concentración de Ac de 1 mg/ml en lugar de 0,8 mg/ml contribuirá solo el 1,7% más al coste final del dispositivo. Una concentración de anticuerpo de 1 mg/ml producirá señales más fuertes, reduciendo cualquier ambigüedad o mala interpretación de los resultados de la prueba. Esto ayuda a mejorar la fiabilidad de la prueba. Por tanto, una concentración de anticuerpo en la mancha control de 1 mg/ml está justificada, y se seleccionó para el desarrollo de la LFT.

Determinación de la concentración óptima de anticuerpo en la mancha de prueba

Se observaron señales de prueba sobre el intervalo entero de concentraciones en la mancha de prueba investigado (de 0,5 mg/ml a 4 mg/ml). La intensidad de color de las manchas de prueba, juzgada a ojo, permaneció aparentemente constante entre concentraciones de anticuerpo de 4 y 2,5 mg/ml. Los valores de la escala de grises de estas señales fluctúan en un simple 1-3,5% entre sí (figura 4). Esto indica que cuando se usa una concentración de Ac de 2,5 mg/ml en la mancha de prueba, la misma intensidad de señal es alcanzable que cuando se usa 4 mg/ml. Usar una concentración de Ac de 2,5 mg/ml también reducirá el coste de la prueba (en $\pm R1,39$ cada una). El valor en la escala de grises de las señales de prueba aumenta en $\pm 13\%$ cuando la concentración de anticuerpo disminuye por debajo de 2,5 mg/ml. Esto implica que la señal de prueba se vuelve más débil. Sin embargo, a simple vista, estas señales son aun claramente visibles. Por tanto, se puede usar una concentración de Ac por debajo de 2,5 mg/ml, digamos 1,5 mg/ml, en la prueba de flujo lateral. Hacer esto ayudaría a reducir el coste por prueba en aproximadamente 92 céntimos. Sin embargo, según la figura 4, los valores en la escala de grises empiezan a fluctuar significativamente cuando la concentración del Ac se reduce por debajo de 2,5 mg/ml. Esto insinúa hacia la introducción de algún tipo de inestabilidad en el dispositivo, que podría finalmente afectar la reproducibilidad de las señales de prueba. Por tanto, mientras que usar concentraciones de anticuerpo por debajo de 2,5 mg/ml puede disminuir el coste del

dispositivo, puede reducir la calidad y fiabilidad de las pruebas. Por tanto, se seleccionó una concentración de Ac en la mancha de prueba de 2,5 mg/ml para el desarrollo de este dispositivo ya que proporciona el equilibrio correcto entre coste y rendimiento.

5 Determinación del volumen óptimo de conjugado

Este estudio se realizó para determinar el volumen óptimo de conjugado que se debe usar en las LFT. En la figura 5, el valor en la escala de grises de las señales de prueba fluctúa según aumenta el volumen del conjugado usado en las pruebas. Estos valores fluctúan en el 2,5%-10% entre sí. Como resultado de esta fluctuación, la influencia de volúmenes aumentados de conjugado en la intensidad de las señales de prueba es difícil de determinar. Ajustar una línea de tendencia polinómica a la curva de valor en escala de grises, sin embargo, ayuda a identificar una tendencia. La línea de tendencia indica una disminución global en los valores grises con un aumento en el volumen de conjugado. Por tanto, la intensidad de la señal de la mancha de prueba aumenta según aumenta la cantidad de conjugado usado en la LFT. Esto indica que aplicando más anticuerpos marcados en la prueba, más *E. coli* marcada con oro alcanza la línea de prueba, produciendo señales de prueba más fuertes. La pendiente de la línea de tendencia permanece más o menos constante según aumenta el volumen de conjugado hasta 7 µl. La línea de tendencia se vuelve más lineal entre 7 µl y 10 µl de conjugado. Esto implica que intensidad de la mancha de prueba alcanza su pico a 7 µl, y usar más conjugado en la prueba hace poco para mejorar la intensidad de la señal y aumentará el coste del dispositivo en 45 céntimos. Sin embargo, aumentando el volumen del conjugado por encima de 7 µl, la intensidad de la mancha control podría mejorar. Esto es debido a que más anticuerpo marcado está disponible para unirse a esta región.

Para probar esta teoría, se hicieron LFT que tenían manchas tanto de prueba como control, pero cargadas con cantidades variables de conjugado. Los volúmenes de conjugados se variaron desde 5 µl a 10 µl, y las pruebas se corrieron usando suspensiones de *E. coli* de 10^8 , 10^7 y 10^6 ufc/ml. Cuando se usan 5 µl de conjugado, se observan manchas control de débiles a ninguna a través de todas las concentraciones bacterianas investigadas. Cuando se usan de 6 µl a 10 µl de conjugado, sin embargo, se forman manchas control (de similar intensidad de color) para todas las concentraciones bacterianas. Por tanto, para formar manchas control nítidas, se debe usar un volumen de conjugado de 6 µl.

Aumentar el volumen de conjugado de 6 μ l a 7 μ l, sin embargo, solo puede estar garantizado si produce una mejora en el límite de detección del dispositivo. Esto es porque la intensidad de las manchas de prueba que se forman cuando se usan 6 μ l y 7 μ l de conjugado (basado en la línea de tendencia), no son significativamente diferentes. A ojo, esta diferencia es insignificante. Por tanto, si el volumen de conjugado aumentado no mejora la intensidad de color de la mancha de prueba, ni mejora el límite de detección del dispositivo, el coste aumentado de usar 7 μ l de conjugado por prueba no se puede justificar.

Prueba de diferentes tipos de membranas en la LFT

Se aplicaron diferentes tipos de membranas de nitrocelulosa en las pruebas de flujo lateral. Se depositaron manchas de prueba en las membranas que después se ensamblaron y corrieron usando muestras con *E. coli* añadida. Se siguió la velocidad de la prueba. Esto incluía el tiempo requerido para que la muestra se desplace por capilaridad al extremo opuesto de la tira, y el tiempo que se necesita para que se desarrolle una señal nítida.

Lo más importante, se examinó la intensidad de la mancha de prueba. Todos los tipos de papel, excluyendo Whatman fusion five, produjeron manchas de prueba. Algunos tipos de papel desarrollaron manchas de prueba completamente redondeadas, mientras que algunos produjeron crestas más que manchas. Esos papeles que produjeron manchas de prueba completamente redondeadas incluían CN140, FF60/100, HF075, AE99 y HF090. La diferencia más sorprendente entre estos papeles y los que produjeron crestas, es la velocidad de capilaridad. La velocidad de capilaridad de estos papeles variaba desde 0,025 a 0,06 cm/s. Las membranas que produjeron crestas eran 125, FP, 240 y AE98 y tenían velocidades de capilaridad que varían desde 0,017 a 0,036 cm/s. Es posible que papeles con una velocidad de capilaridad mayor (y por tanto, una fuerza de capilaridad más fuerte) sean capaces de arrastrar los complejos *E. coli*-Ac-oro a través del margen inferior de la mancha de prueba más rápido, reduce su tiempo de contacto con estos Ac y por tanto limita el cambio de unión que se produce en este punto. Además, debido al efecto anillo de café experimentado durante el secado, los anticuerpos están más concentrados en los márgenes de las manchas. Podría ser que las membranas con velocidades de capilaridad más lentas permitan más tiempo de contacto entre el complejo *E. coli*-Ac-oro y el margen inferior de la mancha. Este tiempo de contacto aumentado podría ser lo suficientemente largo para unir permanentemente la *E. coli* en su lugar en esta área. De ahí, la formación de una señal en forma de cresta. Además, las líneas en forma de cresta tienen una intensidad mucho más oscura que las manchas completamente redondeadas. Esto se puede explicar por el hecho

- de que las nanopartículas de oro están, en el caso de las líneas con forma de cresta, concentradas en un área mucho menor comparadas con esas líneas en las manchas completamente redondeadas. Como resultado de estas pruebas se ha decidido que se usarán membrana con un tamaño de poro mayor para el desarrollo de este dispositivo. Estos tipos
- 5 de papeles permiten que la prueba corra más deprisa sin comprometer su sensibilidad, aseguran que las bacterias *E. coli* de 2 μm viajarán a través del papel sin quedar atrapadas o atascadas, y ofrecen una posibilidad mayor de desarrollar manchas de prueba completamente redondeadas.
- 10 La tinción de fondo es otro aspecto importante a considerar cuando se selecciona una membrana. Se producen dos tipos de tinción, tinción global de la membrana por nanopartículas de oro, y depósito no específico de oro en la mancha de prueba. Para prevenir tal tinción, las nanopartículas de oro y las membranas de prueba se bloquearon adecuadamente. Sin embargo, se encontró que el tipo de membrana usado en la LFT influye
- 15 en el nivel de tinción. Cada tipo de papel experimenta un tipo específico de tratamiento. Por tanto, cada tipo de papel contiene cantidades y tipos variables de tensioactivos y otras sustancias químicas. Como resultado, propiedades tales como carga electrostática, humectabilidad, etc., son diferentes para cada membrana.
- 20 Se encontró la membrana Whatman Prima 125 era la más óptima para esta aplicación. Produce el menor ruido de fondo, posee una velocidad de capilaridad rápida y produce manchas de prueba completamente redondeadas. Sin embargo, se encontró después que esta membrana ya no se fabrica. Se introdujo una membrana de sustitución (HF80HP de GE Health) y se considera la versión actualizada de Prima 125. Esta membrana se compró, y se
- 25 encontró óptima para la aplicación particular.

Tiempo de prueba óptimo

- Se determinaron los valores en la escala de grises de las manchas de prueba que se
- 30 formaron después de dejar varias LFT reposar en su muestra y correr durante 30 segundos a 30 minutos (datos no mostrados). Se encontró que los valores en la escala de grises disminuyen de 142 a 110 unidades según aumentó el tiempo de prueba de 0,5 a 8 minutos. Esto indica un aumento en la intensidad de color de la mancha de prueba. La mancha de prueba en la LFT probada a 8 minutos parece de menor tamaño que las manchas de prueba
- 35 en las otras LFT. Como resultado, la intensidad de color en la mancha de prueba en esta LFT es mayor (teniendo un valor menor en la escala de grises). Por tanto, el punto de 8

minutos se omite en este análisis ya que no se puede comparar equitativamente con las otras intensidades de las señales de prueba. Entre tiempos de prueba de 6 y 16 minutos, los valores en la escala de grises dan una media de aproximadamente 119, fluctuando en ± 10 unidades en la escala de grises. El valor en la escala de grises de la mancha de prueba alcanza su valor mínimo y por tanto mayor intensidad después de correr la LFT durante 18 y 20 minutos. Las LFT que se corrieron durante más de 20 minutos produjeron señales de prueba más débiles, cuyos valores de la escala de grises alcanzaron niveles similares al obtenido a 6 a 16 minutos. Esto podría haber ocurrido como resultado de la evaporación o flujo de retorno debido a los tiempos de carrera más largos. Por tanto, un tiempo de carrera de 20 minutos parece óptimo.

Tiempo de secado óptimo

Este estudio se realizó para determinar cuánto tiempo después de correr la prueba se deben ver e interpretar los resultados. Si se lee demasiado pronto, la mancha de prueba en la prueba de flujo lateral puede ser poco nítida (o subdesarrollada) ya que los Ac y el analito de muestra pueden haber tenido tiempo insuficiente para interaccionar. Alternativamente, las pruebas no se deben leer demasiado después de ser corridas, ya que el flujo de retorno de la muestra puede volverse problemático. Se encontró que la intensidad de la mancha de prueba aumentaba después de 2 minutos de secado. Esto está indicado por una disminución en el valor en la escala de grises desde 218,6 a 0,5 minutos a 206 a 2 minutos. Después de ello, el valor en la escala de grises permanece estable, fluctuando entre 206 y 201 unidades de escala de grises, hasta un tiempo de secado de 20 minutos. A los 22 minutos, la intensidad de la señal aumenta bruscamente, representado por una disminución repentina en el valor en la escala de grises. Entre 22 y 30 minutos de secado, el valor en la escala de grises da una media a aproximadamente 194,5 unidades, el menor valor en la escala de grises observado durante este estudio. La intensidad de la señal de prueba se reduce después de una hora de secado, lo que indica que las LFT no se deben leer más de una hora después de haberse corrido. La intensidad de señal más débil se obtuvo después de menos de 2 minutos de secado. Por tanto, los resultados de la prueba no se deben leer antes de 2 minutos después de retirar la LFT de la muestra. Esta diferencia en valores en la escala de grises no se puede traducir en una mejor señal visual ya que la diferencia es demasiado pequeña para ser advertida a simple vista. Por tanto, para resultados cualitativos, la señal de prueba se puede leer 2 minutos después de haberse retirado de la muestra. Cuando se requiere cuantificación, sin embargo, la señal de prueba se debe leer solo después de 25 minutos de secado. De esta manera se determinaría la verdadera

intensidad de la señal de prueba y se puede comparar a una curva de calibración para calibrar la concentración de analito en la muestra.

Posición de la línea de prueba

5

Este experimento se realizó para determinar cómo influye la distancia entre la almohadilla de conjugado y la mancha de prueba en la intensidad de la señal de prueba final. Las manchas de prueba se colocaron para estar a 4 mm, 7 mm, 12 mm y 13 mm de la almohadilla del conjugado. A ojo, la intensidad de las señales de prueba parece aumentar según aumenta la distancia entre la mancha de prueba y la almohadilla del conjugado. La curva de valores en escala de grises confirma esto. Los valores grises obtenidos cuando las manchas de prueba se colocan a 13 mm y 12 mm son menores que los obtenidos cuando las manchas de prueba se colocan a 7 mm y 4 mm. Cuando la mancha de prueba se coloca más lejos de la almohadilla del conjugado, hay más tiempo disponible para que las bacterias y el conjugado interaccionen y se unan entre sí, antes de quedar atrapadas en la mancha de prueba. Este tiempo de reacción aumentado asegura que más *E. coli* se marca y por tanto más *E. coli* marcadas quedan atrapadas en la mancha de prueba. Esto produce una señal de prueba más oscura y más fuerte. Por tanto, colocar la línea de prueba más lejos de la almohadilla del conjugado ayuda a aumentar la intensidad de color de las manchas de prueba. Sin embargo, considerando el pequeño tamaño del dispositivo y la necesidad de hacer espacio para una mancha control en la membrana, hay un límite a cómo de lejos se puede colocar la mancha de prueba de la almohadilla del conjugado. No obstante, esta información ayuda a que los desarrolladores sepan que maximizar la distancia entre el conjugado y la mancha de prueba puede ayudar a mejorar las intensidades de la señal de prueba.

25

Efecto que tiene una concentración de anticuerpo en la mancha de prueba y conjugado aumentada y un volumen de conjugado aumentado en el límite de detección del dispositivo

El análisis en la escala de grises realizado durante la determinación de la concentración óptima de Ac en las manchas de prueba indica que las intensidades de señal de las manchas de prueba se pueden aumentar aumentando la concentración de anticuerpo de la mancha de prueba. Sin embargo, mientras que los valores en la escala de grises indican que las manchas de prueba formadas a 4 mg/ml son más oscuras que las formadas a 2,5 mg/ml, a ojo, la diferencia no se nota. Por tanto, ambas señales parecen igualmente visibles a simple vista. El uso de una concentración de Ac mayor de 2,5 mg/ml, por tanto, no se justificaba, ya que el beneficio no supera el coste aumentado del sensor. Sin embargo, si la

35

concentración aumentada en la mancha de prueba mejorara el límite de detección de las LFT, incluso en una sola vez, su uso se justificaría. Anteriormente se mostró que aumentar el volumen de conjugado en las LFT aumenta la intensidad de señal de la mancha de prueba. Sin embargo, usar un volumen mayor de conjugado solo se justificará, como en el

5 caso de aumentar la concentración de Ac en la mancha de prueba, si se puede traducir en un límite de detección mejorado.

Se fabricaron LFT con un volumen de conjugado y concentración de anticuerpo en la mancha de prueba aumentados para determinar la influencia que esto tendrá en el límite de

10 detección del dispositivo. La concentración de anticuerpo en el conjugado también se aumentó para determinar si esto también tendría algún efecto en la sensibilidad del dispositivo. La concentración de la muestra probada en la LFT empezó a 10^8 ufc/ml, y disminuyó en incrementos de 10^1 ufc/ml hasta 10^0 ufc/ml. Se corrió una prueba control negativo usando solo tampón fosfato. Se determinó que cuando se usó una mayor

15 concentración en la mancha de prueba, el límite de detección del dispositivo permaneció en 10^6 ufc/ml. Este es el mismo límite de detección obtenido cuando se usó una concentración en la mancha de prueba de 2,5 mg/ml. Por tanto, usar una mayor concentración de Ac en la línea de prueba no está justificado incluso aunque la intensidad de la señal misma mejora.

20 También se probaron LFT fabricadas con una concentración de Ac aumentada en el conjugado donde la concentración de la muestra usada en cada LFT aumentó de 10^3 ufc/ml a 10^8 ufc/ml. Se corrió una prueba control negativo con tampón fosfato. Estas pruebas se corrieron con *E. coli* 0157:H7 muertas por calor y se encontró que el límite de detección era 10^5 ufc/ml. Por tanto, no se produce cambio en el límite de detección con un aumento en el

25 volumen de conjugado. La razón para el límite de detección disminuido de la carrera de LFT con *E. coli* muertas por calor comparadas con *E. coli* vivas, es la afinidad aumentada que los anticuerpos en la prueba tienen por los organismos muertos por calor. Los animales usados para producir los anticuerpos usados en la LFT se inmunizaron realmente con *E. coli* muertas por calor. Como resultado, estos anticuerpos se produjeron en respuesta a los

30 organismos muertos por calor y, por tanto, se unirán siempre a estos organismos más sensiblemente.

También se corrieron pruebas con un volumen de conjugado aumentado. La concentración de la muestra disminuyó de 10^8 ufc/ml hasta 10^0 ufc/ml. Se corrieron pruebas control

35 negativo con tampón fosfato.

Las LFT fabricadas usando un volumen de conjugado aumentado no mostraron mejora en el límite de detección, incluso aunque se produce una mejora en la intensidad de la mancha de prueba. En un intento final para mejorar el límite de detección del sensor, se hicieron LFT con una combinación de un volumen y concentración de anticuerpo de conjugado aumentados y una concentración de Ac en la mancha de prueba aumentada. Estas LFT tampoco demostraron mejora en el límite de detección. Por tanto, parece que el sensor se ha optimizado por completo y no se puede hacer nada más para mejorar la sensibilidad del sensor. Se hizo un ELISA en los anticuerpos usados tanto en el conjugado como en la mancha de prueba del sensor. Se encontró que ambos Ac tenían un límite de detección de 10^6 ufc/ml. Por tanto, se puede concluir que siempre que se use este par particular de Ac, y se use en el formato LFT estándar con nanopartículas de oro, el límite de detección no se puede cambiar.

Conclusión

Se ha demostrado un método de bajo coste para la fabricación de sensores de flujo lateral basados en papel. Se cree que los sensores desarrollados usando este método sirven bien para la demostración de prueba de concepto. Usando estudios de optimización iniciales, cubiertos en este ejemplo, se puede calibrar el rendimiento final del sensor. Se encontró que aumentar la concentración y volúmenes de biorreactivo usado en la LFT indefinidamente, no se traduce en un rendimiento del sensor mejorado. Los valores óptimos para estos parámetros son los que alcanzan el equilibrio correcto entre rendimiento y coste de fabricación.

Ejemplo 2

*Detección de E. coli usando tecnología de flujo lateral y microfluídica basada en papel:
Evaluación del rendimiento de la prueba de flujo lateral*

Sensibilidad y especificidad

La especificidad es una estimación estadística de la capacidad de la prueba para identificar una muestra negativa verdadera. Una prueba específica no producirá una señal de prueba positiva en presencia de bacterias diferentes que su diana, que en este caso, es *E. coli*. Por tanto, la especificidad proporciona una indicación de la reactividad cruzada de la prueba. La sensibilidad es una estimación estadística de la capacidad de la prueba de identificar

exactamente muestras positivas verdaderas. Por tanto, una prueba sensible siempre producirá resultados de prueba positivos cuando están presentes bacterias diana y están dentro los límites de detección de la prueba. La sensibilidad y la especificidad se calculan como sigue:

5

Sensibilidad = Verdaderos positivos/(Verdaderos positivos + Falsos negativos) x 100%

Especificidad = Verdaderos negativos/(Verdaderos negativos + Falsos positivos) x 100%

10 Para el análisis específico en la prueba de flujo lateral, se usaron seis tipos diferentes de bacterias. Estas bacterias fueron amablemente proporcionadas por la unidad de Natural Resources and Environment (NRE) en el CSIR e incluyen: *E. coli* K12, *E. coli* 0157:H7, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y *Acinetobacter*.

15 Cada tipo de bacteria se resuspendió en tampón fosfato para crear una solución de 10^8 ufc/ml y después se probó en pruebas de flujo lateral, que se siguieron para el desarrollo de una señal de prueba positiva. Se realizaron un total de 120 pruebas. Para determinar el límite de detección de la prueba, se usó dilución en serie para generar muestras que tenían concentraciones de *E. coli* 0157:H7 que variaban desde 10^8 a 10^0 ufc/ml. Estas muestras se
20 probaron después en las LFT. La menor concentración bacteriana que produce una señal de prueba positiva se considera el límite de detección del dispositivo. Para determinar la sensibilidad de la prueba, se usaron suspensiones de *E. coli* 0157:H7 y K12 a concentraciones de muestra variables. Se realizaron un total de 300 pruebas.

25 Detección de bacterias muertas

Para determinar si se pueden detectar bacterias muertas en las LFT, muestras de *E. coli* K12 y 0157:H7, resuspendidas a 10^8 ufc/ml, se bañaron con cantidades variables de cloro para matar las bacterias, y después se probaron en la LFT. Como no había disponible cloro
30 líquido, se usó lejía doméstica para estos experimentos. La lejía contiene el 2% de hipoclorito de sodio, que se traduce a 20000 ppm de cloro disponible. Para variar las concentraciones de cloro a las que se expusieron las bacterias, se usó la ecuación (1).

$$\begin{array}{ll} C_1V_1 = C_2V_2 & (1) \\ \text{Por ejemplo, } 20000 \text{ ppm } (V_1) = 8\text{ppm } (1250 \mu\text{l}) & (1. 1) \\ V_1 = 0,5 \mu\text{l} & (1. 2) \end{array}$$

Por tanto, para exponer las bacterias a una concentración de cloro de 8 ppm, se añaden 0,5 µl de lejía a 1249,5 µl de la muestra de *E. coli*. De esta manera, las suspensiones bacterianas se expusieron a concentraciones de 2 ppm a 1000 ppm y en algunos casos incluso mayores. Las bacterias se pusieron en contacto con las diferentes concentraciones de cloro durante 30 minutos para matarlas. Para confirmar que las bacterias estaban de hecho muertas, las bacterias bañadas en cloro se cultivaron en medio nutritivo durante la noche a 37°C. La ausencia de crecimiento después de 24 horas confirmó que las bacterias estaban muertas. También se investigaron varios tiempos de contacto. Esto se hizo para determinar durante cuánto tiempo se necesita incubar juntos las bacterias y el cloro para asegurar que las bacterias mueren. Los tiempos de contacto investigados se variaron desde 1 minuto a 60 minutos, después de lo cual cada suspensión se hizo crecer en medio nutritivo durante la noche. Esas concentraciones de cloro y tiempos de contacto que demostraron eficacia en matar bacterias se usaron después para matar las bacterias usadas para realizar este estudio. Para realizar estas pruebas, se ensayaron 200 µl de la solución cloro-*E. coli* en la LFT.

El fin de esta investigación es primeramente identificar si las LFT detectan bacterias muertas, es decir, determinar si las LFT son capaces de distinguir bacterias muertas de vivas. En segundo lugar, si las LFT pueden distinguir bacterias muertas de vivas, el fin es determinar la dosis de cloro a la que esto se produce. Esta concentración se puede comparar después con la usada actualmente para desinfección en la industria de tratamiento de agua. Esto ayudará a determinar si solo las bacterias vivas serán detectadas cuando se usa LFT para analizar tales muestras medioambientales.

25 Movimiento de bacterias a través de la matriz de papel

Este estudio se realizó para entender mejor cómo migran las bacterias de la almohadilla de muestra a la mancha de prueba de la prueba de flujo lateral. Los diferentes tipos de papel que hacen la LFT tienen estructuras complejas hechas de poros y fibras de celulosa elongadas, y se diferencian entre sí en varias maneras. La posibilidad de que las bacterias queden atrapadas en esta matriz compleja es alta, sin embargo, el nivel al que quedan atrapadas se desconoce. La información de este estudio ayudará a proporcionar conocimiento sobre si todas las bacterias contenidas en la muestra realmente alcanzan la mancha de prueba y experimentan detección. Si muchas bacterias quedan atrapadas antes de alcanzar la mancha de prueba, menos bacterias están disponibles para detección. Esto puede producir que el límite de detección descrito de la prueba sea peor de lo que realmente

es. Por ejemplo, tome el caso de una LFT que produce una señal solo cuando un mínimo de 10^5 ufc está contenido en la muestra. Asumiendo que las pérdidas de bacterias son significativas y solo 10^3 ufc alcanzan la mancha de prueba, el límite de detección real de la prueba es 10^3 ufc y no 10^5 ufc, como se describirá. Idealmente, cuando se cargan 10^3 ufc en la muestra, las 10^3 ufc enteras experimentarán detección e indicarán el verdadero potencial del sensor que se analiza. Caracterizar el grado de atrapamiento de bacterias en el papel, por tanto, ayudará a los desarrolladores de sensores de papel a entender mejor las pérdidas de analito en un dispositivo, permitiéndoles construir o diseñar sus dispositivos de tal manera que se minimicen tales pérdidas.

Determinar el número exacto de bacterias atrapadas en las regiones inferiores de la LFT una vez ha cesado el movimiento de la muestra es de alguna manera difícil. Esto se debe principalmente a la estructura compleja del papel. Un método es liberar las bacterias atrapadas de diferentes regiones del papel en tampón mediante elución, cultivo del tampón de elución en agar nutritivo y recuento del número de bacterias que crece. Sin embargo, este método solo dará una idea de la cantidad de bacterias atrapadas en las varias regiones de la prueba. Determinar el número exacto es difícil ya que algunas bacterias pueden no liberarse del papel. Otra técnica que puede indicar el grado de atrapamiento es teñir o colorear *E. coli* (sea con un marcador fluorescente o colorimétrico) y después enjuagar este a través de la prueba de flujo lateral. De esta manera, se puede visualizar el atrapamiento. Sin embargo, incluso este método es solo cualitativo. Una desventaja del análisis visual es que puede ser difícil ver las señales de las bacterias atrapadas marcadas en la superficie inferior del papel y en el refuerzo adhesivo, y por tanto se pierden. Esto es porque las señales colorimétricas visuales solo surgen de unos pocos micrómetros superiores de la superficie del papel.

Por tanto, determinar el número exacto de bacterias atrapadas en el papel es difícil. Sin embargo, usando estas técnicas puede ser posible obtener una idea del número de bacterias que se quedan atrapadas en la LFT y determinar el efecto que esto tiene en el rendimiento del sensor. De esta manera se pueden identificar esas regiones del sensor que producen el mayor atrapamiento de modo que se pueden tomar pasos para deducir esto. Esta información es útil especialmente últimamente, cuando la industria de sensores de papel recibe mucha atención. Hasta la fecha, no hemos encontrado información que ilustre el nivel de atrapamiento del analito en sensores de papel, y el efecto que esto tiene en el rendimiento del sensor. Esta información contribuye al desarrollo de sensores de alta calidad.

Para los estudios de elución, se corrieron LFT con suspensiones de *E. coli* K12 que tenían concentraciones de 10^8 y 10^3 ufc/ml. Una vez corridas las LFT, sus diferentes secciones se separaron asépticamente. Para la prueba de 10^3 ufc/ml, se usaron la almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, mancha de prueba, mancha control y mecha. Para la prueba de 10^8 ufc/ml, se usaron las mismas secciones, aparte de la mecha. Las secciones separadas se colocaron en tubos de ensayo de vidrio separados que contenían 600 µl de PB y se agitaron con el vórtex suavemente para fomentar la liberación de las bacterias del papel en el tampón. Una vez se completó este paso de elución, el tampón se inoculó en placas Petri con medio nutritivo. Puesto que una placa individual solo se puede inocular con 100 µl, se usaron 6 placas Petri por sección de la LFT para cultivar los 600 µl enteros del tampón de elución. Para determinar el número total de unidades formadoras de colonias liberadas de cada sección de la LFT, se sumaron las colonias que se forman en las 6 placas.

Para confirmar que *E. coli* estaba de hecho presente en las muestras usadas para este análisis, se cultivaron 100 µl de la muestra original y demostraron crecimiento positivo. Para servir como control negativo, se corrió tampón fosfato (sin *E. coli*) en una prueba de flujo lateral. Esta LFT también se separó en sus secciones constituyentes que se pasaron a través del proceso de elución, después de lo cual se cultivó el tampón de elución. Como se esperaba, no se observó crecimiento.

Para todos los estudios anteriormente mencionados se corrieron suspensiones de *E. coli* K12 (10^8 y 10^3 ufc/ml) en un dispositivo de flujo lateral cargado con anticuerpos anti-*E. coli*-0157:H7 en el conjugado y anticuerpos anti-*E. coli*-“todo O y K” en la línea de prueba. Puesto que los Ac del conjugado eran específicos para la cepa 0157:H7, no se unirían a *E. coli* K12. Los Ac de la mancha de prueba (TS) detectan una gama más amplia de *E. coli* y por tanto es más probable que se unan a *E. coli* en la mancha de prueba. Sin embargo, puesto que *E. coli* no está marcada, no se observará una señal en la mancha de prueba. La posibilidad de la unión de *E. coli* a la mancha de prueba se debe tener en cuenta cuando se da cuenta de las bacterias durante los estudios de elución.

Para los estudios de tinción colorimétrica, *E. coli* K12 se cultivó en agar McConkey. En este agar *E. coli* crece como colonias rojas. Las colonias rojas de *E. coli* se resuspendieron en tampón fosfato a una concentración de aproximadamente 10^7 ufc/ml y se corrieron en la

prueba de flujo lateral. Las bacterias rojas se siguieron según se movían hacia arriba en la longitud de la tira de prueba.

E. coli-0157:H7 (10^5 ufc/ml) también se marcó fluorescentemente usando anticuerpos anti-*E. coli*-0157:H7 etiquetados con nanopartículas de poliacrilonitrilo chromeon 470 (Sigma Aldrich). Estas bacterias marcadas fluorescentemente se dejaron fluir arriba de una prueba de flujo lateral de media tira. Las pruebas de media tira se ensamblan solo con una membrana de nitrocelulosa (cargada con manchas de prueba y control) unidas a una mecha absorbente, ensamblando ambas en una tarjeta de refuerzo adhesiva. No se incluyen almohadillas de conjugado y muestra. Para visualizar la fluorescencia después de correr las medias tiras, las tiras se secaron durante 10 minutos en un horno a 37°C, se colocaron en un microscopio de fluorescencia invertido, y se excitaron usando una longitud de onda de 470 nm. El colorante emite a una longitud de onda de 611 nm, que se visualizó en el microscopio. Usando todas las técnicas anteriores, se obtuvo una tendencia que representa el nivel de atrapamiento de bacterias en una prueba de flujo lateral.

Pruebas de flujo continuo

Las pruebas de flujo continuo son otra forma rápida de pruebas diagnósticas inmediatas. En este formato de ensayo, una sección de la membrana de nitrocelulosa se carga con manchas de prueba y control y después se coloca encima de un trozo de almohadilla absorbente. El fluido de muestra se carga en la membrana, entra en contacto con las manchas de prueba y control, después sigue fluyendo hacia abajo en la almohadilla absorbente. Por tanto, las pruebas de flujo continuo no tienen almohadilla de muestra y conjugado, lo que implica que el atrapamiento de las bacterias en estas regiones no puede influir el rendimiento del sensor.

Se hizo una prueba de flujo continuo para identificar la influencia que tiene el atrapamiento de bacterias en el rendimiento de las pruebas de flujo lateral. Para fabricar la prueba de flujo continuo, se usó una membrana de celulosa sin reverso reforzado de 1 cm por 1 cm. Se diluyó anticuerpo anti-*E. coli* de conejo (ABD serotec) a 2,5 mg/ml y se cargó en la membrana, sirviendo como la mancha de prueba. La mancha de prueba se secó en el sitio durante 30 minutos a 37°C, se bloqueó usando una solución de bloqueo de membrana y después se secó durante 1 hora a 37°C. Se prepararon trozos de 1 cm por 1 cm de almohadilla absorbente. Para ensamblar la prueba de flujo continuo, la almohadilla absorbente se colocó directamente detrás de la membrana, y se emparedó entre 2 clips

grandes. Los clips se elevan para prevenir que la almohadilla absorbente haga contacto con cualquier otra superficie que pueda influir el rendimiento del sensor.

Las muestras se prepararon como sigue. Se hicieron suspensiones de *E. coli* 0157:H7, que variaban en concentración de 10^8 ufc/ml a 10^1 ufc/ml. Se añadió un volumen de 200 µl de cada dilución a tubos de ensayo de vidrio, en los que se habían añadido 6 µl de conjugado de oro y dejó estar en contacto durante 7 minutos. El límite de detección de estas pruebas de flujo continuo se examinó y se discute en el ejemplo 2. Sin embargo, se debe considerar que la membrana usada para este estudio era diferente a la membrana usada en las pruebas de flujo lateral. Esto es porque la membrana de la prueba de flujo lateral no tiene reverso reforzado y no es adecuada para uso en un sistema de flujo continuo.

Análisis por microscopía electrónica de barrido

Para entender más cómo se mueven las bacterias a través de la matriz de papel de las pruebas de flujo lateral, se tomaron imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de las diferentes secciones de la LFT. Se corrieron LFT con muestras de *E. coli* 0157:H7 muertas por calor (10^7 ufc/ml) y con tampón sin nada agregado (esto sirvió como control negativo). Una vez corrida la prueba, las LFT se separaron asépticamente en sus partes constituyentes. Estas incluyen la almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, región de mancha de prueba y región de mancha control. Cada sección se recubrió por pulverización catódica con oro para mejorar su visibilidad en MEB y después se analizaron. Además de examinar las bacterias presentes en las diferentes secciones de la LFT, también se analizaron las características estructurales y morfológicas de los diferentes tipos de papel usados para crear la LFT. El fin de este trabajo era confirmar si las bacterias se quedaban atrás o no en las regiones inferiores de la LFT una vez corrida la prueba.

Detección de un organismo único de *E. coli* en la prueba de flujo lateral

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Estándares Nacionales Sudafricanos (SANS 241, 2011), no debe haber *E. coli* presente en agua potable. Como resultado, para ser aplicable al análisis de agua potable, los sistemas de detección de *E. coli* deben ser capaces de detectar tan poco como 1 ufc en una muestra de agua de 100 ml. Sin embargo, para el análisis de agua residual, esto puede cambiar. El nivel de microbios permitido en el efluente que sale de las instalaciones de tratamiento de agua residual está controlado por legislación gubernamental, y con frecuencia es específico para cada

instalación de tratamiento de agua. Los niveles aceptables habitualmente están guiados por la localización de la planta, y el cuerpo de agua al que entra el efluente. El nivel de *E. coli* generalmente permitido en efluente de aguas residuales es 1000 bacterias por 100 ml de agua. Esto implica que para análisis de aguas residuales, los sistemas de detección de *E. coli* deben tener la capacidad de detectar 1000 *E. coli* por muestra de 100 ml. Sin embargo, la mayoría de los sistemas empleados para análisis de aguas residuales aún tienen la capacidad de detectar un único organismo.

Para este estudio, se investigó la capacidad de la prueba de flujo lateral para detectar una única bacteria *E. coli*. Se encontró que el límite de detección de la LFT era 10^6 ufc/ml. Por si misma, la LFT puede, por tanto, solo aplicarse para análisis de agua durante estallidos de emergencia, cuando son prevalentes grandes cantidades de bacterias. Se decidió que incorporando un paso de preenriquecimiento, la LFT podría potencialmente detectar una única *E. coli*. Durante el preenriquecimiento, las bacterias se colocan en medio rico en nutrientes, se exponen a temperaturas favorables para el crecimiento y de esta manera se cultivan a niveles que son detectables en la LFT (10^6 ufc/ml). Debido a la incorporación de este paso, sin embargo, la duración del procedimiento de prueba se vuelve más largo. Sin embargo, si el tiempo requerido para detectar una única bacteria es menor que el requerido durante métodos de detección convencionales de *E. coli*, la prueba será todavía ventajosa para la industria de control de agua. Un tiempo más rápido al resultado implica que la información respecto a la seguridad de las fuentes de agua potables se obtiene antes, lo que ayuda a prevenir la propagación de la enfermedad. Para determinar si el preenriquecimiento permite que la LFT detecte una *E. coli*, se hizo lo siguiente.

Una suspensión de *E. coli* 0157:H7 de $2,7 \times 10^8$ ufc/ml se diluyó en serie a concentraciones de $2,7 \times 10^2$ ufc/ml, $2,7 \times 10^1$ ufc/ml y $2,7 \times 10^0$ ufc/ml. Se inoculó 1 ml de cada una de las tres suspensiones en 11 placas Petri cada una de las cuales contenía 5 ml de caldo nutriente no selectivo. Las placas Petri se incubaron después a 37°C durante 11 horas. Después de cada 1 hora de incubación, 1 placa Petri para cada concentración se probó usando 3 pruebas de flujo lateral. Esto se hizo hasta que la LFT desarrolló una señal de prueba positiva. Se inocularon tres placas Petri adicionales que contenían 5 ml de caldo con 1 ml de cada concentración muestra, y se probaron sin haber tenido incubación. Esto sirvió como un control experimental. Ninguna de estas LFT produjo señales de prueba positivas.

Para asegurar que las muestras de 10^2 , 10^1 y 10^0 ufc/ml realmente contenían estas cantidades de bacterias, se cultivó 1 ml de cada muestra en agar nutriente. Como 1 placa

Petri solo se puede inocular con 100 µl, se usaron 10 placas por muestra. Por tanto, para determinar el número total de colonias por ml de muestra (para cada concentración), se sumaron las colonias que se forman en las 10 placas.

5 Análisis de muestras de agua medioambientales

Para determinar la capacidad de la prueba de flujo lateral para manejar muestras de agua medioambientales, se recogieron muestras de efluentes de una instalación de tratamiento de aguas residuales local (Tshwane Water) y se analizaron. Como el contenido en *E. coli* era bajo en estas muestras (menor de 100 ufc por 100 ml de muestra), se incluyó el paso de preenriquecimiento durante este análisis.

Para asegurar que la muestra de efluente fluye a través de la prueba de flujo lateral y produce una mancha de prueba si está presente *E. coli*, a las muestras de efluentes se les agregó *E. coli* 0157:H7 y se probaron. Se prepararon suspensiones de *E. coli* con concentraciones que variaban desde $\pm 10^8$ ufc/ml a 10^0 ufc/ml. Este estudio se hizo para asegurar que el efluente fluye a través del papel sin atascarlo y que cualquier compuesto químico y/o biológico en el efluente no impide el desarrollo de la señal o produce ruido de fondo alto.

Para asegurar que las cepas y serotipos de *E. coli* en el efluente se pueden detectar en la LFT, se obtuvo una muestra de la entrada de la planta. La entrada contendrá todos los tipos diferentes de *E. coli* que se podrían posiblemente producir en el efluente tratado, aunque a una concentración mucho mayor. En este ejemplo, las LFT solo se probaron usando 2 cepas de *E. coli*, 0157:H7 y K12. El ejemplo 4 expone si cepas medioambientalmente comunes de *E. coli* se podrían detectar en la LFT. Hay poca probabilidad de que haya grandes cantidades de *E. coli* 0157:H7 (una cepa normalmente encontrada en alimentos) o *E. coli* K12 (una cepa de laboratorio) en la muestra de entrada. Por tanto, cualquier señal de prueba positiva que surja sería debido a la detección de cepas diferentes de estas.

El procedimiento combinado de preenriquecimiento y prueba en LFT se usó para analizar la muestra de efluente. Como es estándar en la industria del agua, se probaron muestras de efluente de 100 ml. Se filtraron veinticuatro muestras de efluente de 100 ml a través de filtros de celulosa de 0,45 µm separados. Cada filtro se colocó en su propia placa Petri relleno con caldo nutriente y se incubó durante varias horas. Durante la incubación, el caldo se probó en una LFT cada hora hasta que se obtuvo una señal de prueba positiva. Se colocaron 12

filtros en medio nutriente general, y se colocaron 12 en medio selectivo de coliformes y *E. coli*.

Comparación con otros kits comerciales: sensibilidad, especificidad, bacterias muertas

5

Se hizo una comparación de rendimiento entre la prueba de flujo lateral de la presente invención y otros 3 sistemas de detección de *E. coli* comerciales. Se evaluaron *E. coli*lert (IDEXX Laboratories, 2011), Microsnap (Hygiena Inc, 2013) y el kit de prueba rápida para *E. coli* 0157:H7 de Cell Biolab (Cell Biolabs, 2011) con respecto a lo siguiente: (1) capacidad
10 para distinguir bacterias muertas de vivas, (2) límite de detección/sensibilidad y (3) especificidad/reactividad cruzada.

Este análisis se hizo para determinar cómo de bien rinde la LFT desarrollada en relación a sistemas que han experimentado validación del mercado. Algunos de estos sistemas de
15 hecho han sido aprobados para la detección de *E. coli* en fuentes de agua globalmente. La información recogida de esta investigación proporcionará una indicación de cómo es de vendible la prueba de flujo lateral, y que aspectos de la prueba aún requieren mejora.

Colilert y Microsnap dependen de la capacidad de dos enzimas, β -glucuronidasa (encontrada en *E. coli*) y β -galactosidasa (encontrada en todas las coliformes) para cortar
20 sustratos específicos que liberan compuestos cromógenos y fluorógenos. Por consiguiente, se usan cambios de color para indicar la presencia de estas bacterias. La prueba de flujo lateral de Cell Biolabs, como la prueba de flujo lateral desarrollada, emplea unión anticuerpo-antígeno para la detección.

25

Para las pruebas Colilert, se prepararon muestras de 100 ml de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enteritidis* y *E. coli* 0157:H7 a una concentración de $1,5 \times 10^1$ ufc/ml. El sustrato Colilert se disolvió en cada muestra de 100 ml y después se transfirió
30 asépticamente en bandejas cuantitativas Colilert. Después de 18-24 horas de incubación a 37°C, se leyeron los resultados. Se siguió un procedimiento similar cuando se probaron muestras de bacterias muertas.

Para determinar el límite de detección de las pruebas de flujo lateral de Cell Biolab para *E. coli* 0157:H7, se hicieron suspensiones de esta bacteria a concentraciones que variaban de
35 10^8 ufc/ml a 10^0 ufc/ml. Se diluyeron 150 μ l de cada muestra con 150 μ l del tampón del fabricante. Las muestras estaban entonces listas para usar. Se siguió un procedimiento

similar cuando se probaron muestras de bacterias muertas. Cuando se usó con muestras que tenían una baja concentración de bacterias, las muestras se filtraron primero para capturar las bacterias en una membrana que después se incubó durante las 18-24 horas prescritas. Se extraen después 150 µl de la muestra enriquecida y se diluyen en 150 µl de tampón antes de correrlas en las tiras de prueba. Cuando se probaron estas LFT para especificidad, muestras de no *E. coli* 0157:H7 se hicieron en suspensiones de 10^7 ufc/ml. Se diluyeron 150 µl de estas suspensiones en tampón antes de correrlas en las LFT.

Para analizar el sistema Microsnap, se prepararon suspensiones bacterianas a 10^4 ufc/ml de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enteritidis* y *E. coli* K12. Se filtraron 100 ml de cada suspensión a través de un filtro de 0,45 µm que se incubó en el caldo nutriente suministrado por el fabricante durante 8 horas. Después de ello, se transfirieron 200 µl de cada muestra enriquecida a pruebas Microsnap individuales, se incubaron durante 10 minutos a 37°C (según las instrucciones del fabricante) y después se leyeron los resultados usando el luminómetro Ensure (lector) proporcionado. Se siguió el mismo procedimiento cuando se analizaron muestras de bacterias muertas.

Resultados y discusión

Sensibilidad y especificidad

El límite de detección de la prueba de flujo lateral se determinó que era 10^6 ufc/ml. Una revisión por Peruski et al. (2003) manifiesta que las pruebas de flujo lateral para microorganismos, basadas en tecnología de inmunoensayo, tienen límites de detección que varían desde 10^8 a 10^5 ufc/ml. Esto indica que la LFT rinde dentro de límites aceptables.

Para el análisis de especificidad, las bacterias enumeradas anteriormente se probaron en las LFT. La producción de una señal de prueba positiva en la LFT indicaba reactividad cruzada entre los anticuerpos y las bacterias no diana. Para determinar la sensibilidad de la prueba de flujo lateral, se probaron suspensiones de *E. coli* K12 y *E. coli* 0157:H7. El número de resultados falsos negativos se usó como una indicación de la sensibilidad de la prueba. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Resultados de las pruebas de sensibilidad y especificidad

Microrganismo	No. de pruebas realizadas	No. de positivos	No de negativos
---------------	---------------------------	------------------	-----------------

<i>E. coli</i> 0157:H7	150	150	0
<i>E. coli</i> K12	150	150	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	30	0	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	30	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	30	10	20
<i>Acinetobacter</i>	30	0	30
Total	420	340	80

Tabla 4: Resumen de los resultados de sensibilidad y especificidad

5	Microorganismo	Verdaderos	Falsos	Falsos	Verdaderos
		positivos	Negativos	positivos	negativos
	<i>E. coli</i>	300	0	-	-
	No- <i>E. coli</i>	-	-	40	80

Por tanto,

10

$$\begin{aligned}
 \text{Sensibilidad} &= VP/(VP+FN) \times 100 \\
 &= 300/(300+0) \times 100 \\
 &= 100\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 15 \quad \text{Especificidad} &= VN/(VN+FP) \times 100 \\
 &= 80/(80+40) \times 100 \\
 &= 67\%
 \end{aligned}$$

Estos resultados indican que la prueba de flujo lateral ofrece una sensibilidad del 100% cuando el recuento de *E. coli* en la muestra está por encima de su límite de detección de 10^6 ufc/ml. En el momento de este análisis solo dos serotipos de *E. coli*, K12 y 0157:H7 estaban disponibles para ensayar. Los anticuerpos usados en la prueba de flujo lateral pueden detectar todas las cepas O y K de *E. coli*. Estas son las cepas más comunes de *E. coli* que existen en el medio ambiente. Todos los tipos conocidos de *E. coli* hasta la fecha contienen el antígeno O. Esto implica que la LFT podría potencialmente detectar todos los tipos de *E. coli*, dependiendo en la capacidad del anticuerpo para detectar las cadenas de antígeno O tanto de longitud larga como corta. Como muchos de estos tipos de *E. coli*, por tanto, necesitan probarse en la LFT para predecir más realísticamente la verdadera sensibilidad

del dispositivo. Esto es importante ya que indicaría el nivel de sensibilidad que se puede esperar cuando se prueban muestras de agua medioambientales.

Se obtuvo un resultado de especificidad del 67% y es principalmente debido a la interacción no específica de la LFT con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Se observó reactividad cruzada con *Salmonella enteritidis*, que se producía en el 33,3% de las pruebas realizadas. Esto puede ser debido a que hay menos sitio de unión antigénica en la bacteria lo que reduce la probabilidad de unirse cada vez, o los epítomos se esconden en algunos casos. No se observó otra reactividad cruzada. Para asegurar que la mayoría de las cepas de *E. coli* son detectadas por la LFT, se emplearon anticuerpos monoclonales para detección. Debido a su naturaleza inherente, los anticuerpos policlonales tienden a mostrar reactividad cruzada, y según el fabricante, se sabe que este anticuerpo particular da reacción cruzada con otras enterobacterias. Este se debe probablemente a que estas bacterias comparten sitios antigénicos comunes con *E. coli*, y sirve como una explicación para la reactividad cruzada con *Salmonella enteritidis* (una enterobacteria). Se sabe que los anticuerpos anti-*E. coli* pueden dar reacción cruzada con *Pseudomonas aeruginosa* debido a los antígenos de superficie comunes compartidos entre estas dos bacterias. Esta podría ser la razón para las débiles señales de prueba obtenidas con *Pseudomonas aeruginosa* en la LFT. La reactividad cruzada con enterobacterias puede no influir negativamente en el rendimiento de las pruebas, ya que una señal de prueba positiva aún indicará que la fuente de agua es insegura. Esta es la principal intención de este dispositivo.

Un estudio reciente por Luyt et al. (2012) indica que la especificidad del sistema de detección Colilert es del 92,8%, sin embargo, Colilert solo puede detectar el 56,4% de todas las cepas de *E. coli* conocidas. Como mencionan Guo et al. (2005), los antígenos O que son diana y se usan para detección por la LFT existen en la mayoría, si no en todos los tipos de *E. coli*. Esto implica que la LFT desarrollada tiene un gran potencial para detectar más del 56,4% de todas las *E. coli* encontradas en el medio ambiente. Para examinar más el rendimiento de la prueba de flujo lateral, se someterá a ensayos de campo en Tshwane Water (Sudáfrica). Durante los ensayos de campo, el rendimiento de la prueba de flujo lateral, con respecto a su sensibilidad, especificidad y velocidad de análisis, se comparará con métodos de detección de *E. coli* convencionales y más recientes.

Detección de bacterias muertas en LFT

35

En las instalaciones de tratamiento de agua, se alcanza desinfección adecuada cuando se usa una dosis de cloro entre 5 ppm y 7 ppm junto con un tiempo de contacto de 30 minutos. En el laboratorio, se dosificaron soluciones de *E. coli* (10^8 ufc/ml) con concentraciones de cloro que variaban de 1 ppm a 8,5 ppm, se incubaron durante 60 minutos y después se cultivaron en medio nutriente. No se observó crecimiento de *E. coli* en ninguna de las placas, lo que indica que incluso a concentraciones de cloro tan bajas como 1 ppm, las bacterias se convierten en metabólicamente inactivas (muertas). La solución original de *E. coli* usada para este estudio (sin empapar con cloro) confirmó que se usaron bacterias vivas en este estudio. Estas placas demostraron crecimiento positivo.

Para determinar el tiempo de contacto requerido, se empaparon suspensiones de *E. coli* con 5 ppm de cloro y se pusieron en contacto durante 2 a 60 minutos. Se seleccionó una concentración de cloro de 5 ppm ya que es comúnmente usada en plantas de tratamiento de agua y se ha confirmado que mata las bacterias. Después de cultivar, ninguna muestra demostró crecimiento. Esto implica que a una concentración de cloro de 5 ppm, 2 minutos de tiempo de contacto es suficiente para matar las bacterias. El control positivo (la muestra de *E. coli* usada para este estudio), demostró crecimiento positivo.

Por tanto, estos parámetros se usaron para matar la *E. coli* usada para evaluar la capacidad de la LFT para distinguir *E. coli* viva de muerta. Las bacterias muertas podrían estar en un estado viable pero no cultivable (VBNC) o completamente disgregadas. Este estudio se hizo para seguir si la LFT desarrolla una señal de prueba positiva cuando se prueban bacterias muertas.

También se empaparon muestras de *E. coli* 0157:H7 vivas con las siguientes concentraciones de cloro: 10 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, 2500 ppm y 3000 ppm. Estas concentraciones hacen las bacterias no cultivables, sin embargo, no se sabe si estas concentraciones son adecuadas para disgregar las bacterias. Para que los anticuerpos en la LFT no detecten *E. coli*, sus antígenos de superficie deben estar ausentes. Esto es porque los anticuerpos usados en la LFT se dirigen a antígenos o epítomos que están en la superficie externa de la bacteria *E. coli*. Puesto que se determinó que 1-8,5 ppm de cloro hace las bacterias no cultivables, cualquier concentración mayor que esta debe hacer lo mismo. Estas altas concentraciones de cloro se usaron para identificar a) la dosis de cloro a la que la LFT ya no detecta la *E. coli* (implicando que las bacterias se pueden haber disgregado por completo), y b) cómo se compara esta dosis a la usada en la industria de tratamiento de agua.

Después de poner en contacto *E. coli* y cloro durante 30 minutos, las muestras se probaron en la LFT. Ninguna de las pruebas produjo señales de prueba positivas, incluyendo la muestra inoculada con 10 ppm de cloro. Mientras que la mancha de prueba en la prueba de 10 ppm demostró una niebla rosa, no se puede considerar como una señal de prueba verdadera especialmente cuando se compara con la intensidad de señal oscura de la LFT usada como control positivo (corrida con una muestra rica en *E. coli* sin clorar). Esto se observa además por el alto valor en la escala de grises de la prueba de 10 ppm en contraste al menor valor en la escala de grises de la LFT control positiva (resultados no mostrados). No se observaron manchas de prueba en las LFT restantes.

Estos resultados indican que concentraciones de cloro de o por debajo de 10 ppm puede producir que las bacterias *E. coli* se rompan y no sean detectadas en la LFT.

A continuación, muestras de *E. coli* 0157:H7 vivas (10^8 ufc/ml) se empaparon con 2 ppm a 30 ppm de cloro. Se observaron señales de prueba positivas fuertes para concentraciones de cloro entre 2 ppm y 10 ppm. A 12 ppm, la intensidad de la señal de prueba se debilita significativamente, y permanece de esa manera hasta una concentración de cloro de 20 ppm. A concentraciones de cloro de 30 ppm y mayores, la señal de prueba desaparece por completo. El descenso en la intensidad de señal a 12 ppm indica que a esta concentración las bacterias pueden empezar a disgregarse, proporcionando una explicación para la intensidad de señal debilitada.

Por tanto, las LFT solo son capaces de distinguir convincentemente bacterias muertas de vivas a concentraciones de cloro por encima de 30 ppm. El cambio en la intensidad de la señal a 12 ppm se podría usar junto con una curva de calibración (que indica qué aspecto debe tener una señal positiva), sin embargo, 12 ppm aunque cerca, todavía está por encima de las concentraciones de cloro usadas durante el tratamiento de agua. No obstante, puesto que los recuentos de *E. coli* en agua tratada siempre estarán muy por debajo del límite de detección del dispositivo (10^6 ufc/ml), siempre se requerirá preenriquecimiento. Mediante el preenriquecimiento, la LFT siempre detectará solo bacterias viables (vivas), ya que solo estas bacterias se pueden cultivar y por tanto detectar. Por tanto, se previene el riesgo de bacterias muertas que produzcan resultados de prueba falsos positivos. El preenriquecimiento es un requisito de la mayoría de las pruebas microbiológicas debido a la necesidad de detectar tan poco como 1 ufc en 100 ml de agua. Este paso de preenriquecimiento asegurará que la LFT detecte solo *E. coli* vivas en una muestra.

Se compraron bacterias muertas por calor como un control positivo del suministrador del anticuerpo. Se confirmó que estas bacterias retenían su estructura celular entera, pero son metabólicamente inactivas por completo. A concentraciones iguales o por encima del límite de detección de la LFT, se observan señales de prueba positivas intensas cuando se ensayan estas bacterias. Por interés, estas bacterias muertas por calor se bañaron con 1 ppm a 3500 ppm de cloro, se incubaron durante 30 minutos, y después se probaron en las LFT. Solo cuando la muestra se baña con niveles de cloro por encima de 1000 ppm, para la formación de señales positivas. Como las bacterias muertas por calor experimentan varios tratamientos para perder su patogenicidad, pero retienen su estructura celular entera, la bacteria puede ser menos susceptible a la disgregación que una bacteria *E. coli* normal. Como resultado, se requiere una concentración de cloro más alta para romper por completo las células. Esto proporciona evidencia adicional de que incluso si las bacterias están metabólicamente muertas, los anticuerpos solo dejarán de detectarlas una vez se han disgregado por completo.

Movimiento de *E. coli* a través de la LFT

Para entender los patrones de crecimiento de *E. coli*, se inocularon varias placas Petri con de 10^1 a 10^7 ufc de *E. coli*. Las placas con recuentos de *E. coli* entre 10^7 a 10^5 ufc mostraron “crecimiento en césped”. Cuando se produce este patrón de crecimiento, no se pueden contar colonias individuales. Las colonias individuales solo se observaron en placas inoculadas con 10^4 a 10^0 ufc.

Estos patrones de crecimiento se usaron como una guía en estimar el número de *E. coli* eluidas de las diferentes secciones de la LFT. Esto es importante especialmente cuando se obtiene crecimiento en césped y no se pueden contar colonias individuales.

Como se corrieron 200 μ l de una muestra de 10^8 ufc/ml en la LFT, aproximadamente 10^7 ufc estaban contenidos en esta muestra. Después de cultivar, todos los tampones de elución para cada sección de la LFT mostraron “crecimiento en césped”. Esto es similar al patrón de crecimiento observado en las placas Petri inoculadas con entre 10^7 a 10^5 ufc. Por tanto, este resultado implica que entre 10^7 (el 100% de la muestra original) a 10^5 ufc (el 1% de la muestra original) se eluyó de cada sección de la LFT. Si se hubieran liberado menos de 10^5 ufc de cualquiera de las secciones, se podrían haber observado colonias individuales. Este resultado implica que bien entre el 1% al 100% de todas las bacterias en la muestra entra en

contacto con la mancha de prueba y experimenta detección, indicando que se produce atrapamiento extenso o escaso de *E. coli* a lo largo de la longitud de la prueba. Para conseguir una mejor indicación de atrapamiento, se usó una muestra de 10^3 ufc/ml, de modo que 10^2 ufc de *E. coli* estaban contenidas en la muestra de 200 µl corrida en la LFT.

5

El tampón de elución de todas las secciones de esta LFT demostró crecimiento de colonias únicas. Los resultados se enumeran en la tabla 5, y se muestran gráficamente en la figura 6. El menor número de *E. coli* se liberó de la sección de la LFT más alejada de la almohadilla de muestra (la mecha), mientras que la mayoría de las bacterias se liberaron de la almohadilla de muestra. Esto indica que la mayoría de *E. coli* queda atrapada en las regiones inferiores de la LFT (almohadillas de muestra y conjugado), o porque la mayoría de las bacterias están unidas al sitio por el anticuerpo de la mancha de prueba.

10

Usando espectrofotometría, se determinó que la muestra original contenía ± 1200 unidades formadoras de colonias. Se liberaron un total de 168 ufc de la LFT entera, implicando que solo el 14% de las bacterias de la entrada están representadas. Las bacterias restantes probablemente no se eluyeron del papel. Si la elución dura (agitación con vórtex) no puede forzar a las bacterias fuera de la matriz del papel se puede estar produciendo atrapamiento intenso. Esto podría estar reduciendo el movimiento de *E. coli* y por tanto previniendo que alcance la mancha de prueba. De las bacterias que se eluyeron, el 44,6% y el 32,1% se liberaron de la almohadilla de muestra y conjugado, respectivamente, las secciones de la LFT en contacto más íntimo a la muestra. Esto es de interés ya que implica que el 10,75% de las bacterias de entrada definitivamente no alcanzan la mancha de prueba. Sin embargo, ya que el material en las almohadillas de conjugado y muestra está diseñado para liberar el conjugado, podrían estar eluyendo más bacterias durante la elución. Así mientras los resultados indican que más bacterias están atrapadas en la almohadilla de la muestra y conjugado, puede ser solo que la membrana de nitrocelulosa atrapa la misma cantidad de bacteria, pero no las libera tan bien durante la elución. Además, la mancha de prueba misma podría tener *E. coli* unida, previniendo que eluyera y respondiendo de esta manera de algo de las bacterias no eluidas. La unión anticuerpo-antígeno parece lo suficientemente fuerte para soportar el tipo de agitación usada para la elución. Cuando una LFT con una mancha de prueba visible se agitó con vórtex, la mancha de prueba permaneció visible después de la agitación, lo que implica que las bacterias marcadas permanecieron unidas.

20

25

30

35

También se realizaron estudios de tinción colorimétrica y fluorescente. La tinción colorimétrica demostró que *E. coli* ciertamente se queda atrapada en las almohadillas de

muestra y conjugado de la LFT. Esto se observa por la tinción roja de estas secciones de la LFT comparadas con el resto de la prueba. La almohadilla de muestra se sumerge directamente en la muestra y, por tanto, es la región donde probablemente se produce más atrapamiento. La tinción roja, como la observada en las almohadillas de muestra y conjugado, no era tan predominante en el resto de la prueba. Se observó una acumulación de color rojo en el principio de la membrana, indicando que alguna bacteria podría haber quedado atrapada aquí. El desarrollo de una señal de prueba, sin embargo, implica que *E. coli* marcada aún alcanza la mancha de prueba. Sin embargo, debido a las pérdidas aparentes al principio de la LFT, el número de *E. coli* que alcanza la mancha de prueba es menor que el contenido en la muestra. La mecha también se cribó para tinción roja, y no se observó ninguna. Esto podría implicar que poca o nada de *E. coli* alcanza esta sección de la LFT.

Se usó una prueba de media tira para el estudio fluorescente. La parte inferior de la membrana de prueba se sumergió en la muestra misma (debido a la ausencia de una almohadilla de muestra). Se encontró que se producía atrapamiento insignificante en la membrana ya que la masa de la fluorescencia se observó solo en la línea de prueba y margen superior de la membrana, cerca de donde estaba colocada la mecha. La mecha misma no se analizó. Se observó algo de fluorescencia en el margen de la muestra de la membrana, pero era mínimo. Estos resultados indican que las almohadillas de muestra y conjugado producen el mayor atrapamiento, ya que tanto el análisis colorimétrico como fluorescente no demostraron tinción en la región inferior de la membrana. Sin embargo, confirmar esto es difícil ya que, si las bacterias están atrapadas en la membrana, es más difícil visualizarlas debido a la estructura densa de la membrana. Viendo como las señales visuales solo surgen de la superficie superior, las bacterias perdidas en la profundidad de la membrana pueden ser más difíciles de ver, ya que estas fibras están empaquetadas estrechamente.

No obstante, el fin de este experimento era mostrar que a) se produce atrapamiento de bacterias, y b) el número de *E. coli* disponible para detección en la mancha de prueba es menor que el que entra en la almohadilla de muestra. Estos resultados indican exactamente esto. La pregunta todavía sin contestar es cuánto de una concentración menor alcanza la mancha de prueba, y si es lo suficientemente significativo para afectar el límite de detección del sensor.

El método de movimiento fluido en sustrato de papel es conocido. Se sabe que películas líquidas masivas se mueven a través de papel pasando a través de canales formados por fibras solapantes y por el relleno masivo de poros de papel. Mientras que *E. coli* son móviles debido a la presencia de flagelos, es improbable que su movimiento a través del sensor de flujo lateral se produzca nadando. Se ha ilustrado que las bacterias se mueven a través de una serie de “carreras y caídas”. Sin embargo, cuando se mueven a través de estructuras porosas, el diámetro limitado de los poros algunas veces es menor que la longitud de sus “carreras”. Esto reduce su difusividad a través del medio. Cuando el tamaño del poro es menor de 10 μm , su movimiento hacia adelante se puede parar por completo. Puesto que los tamaños de los poros del papel usado en la LFT varían entre 12 a 15 μm , es seguro concluir que *E. coli* no puede nadar arriba de la LFT. También se ha mostrado que las bacterias prefieren moverse en enjambres en lugar de individualmente. Considerando toda la información anterior, se cree que las bacterias pasan a través de la LFT en enjambres, moviéndose a lo largo de la LFT con el líquido masa (tampón). Según se extiende el líquido a través del papel, las bacterias resuspendidas también lo hacen y logran alcanzar la mancha de prueba y experimentar detección. Una vez la muestra se agota o el papel no puede absorber más fluido (lo que ocurra primero), el movimiento del fluido de muestra para, así como las bacterias. Por tanto, las bacterias permanecerán donde estaban colocadas por último, que podría ser en cualquier lugar a lo largo de la longitud de la tira de prueba. Si este método de movimiento es cierto, entonces enjuagar la prueba con tampón adicional podría ayudar a transferir las bacterias restantes a la mancha de prueba, permitiéndolas entrar en contacto con los anticuerpos y experimentar detección. Por tanto, bacterias que de otra manera se hubieran “perdido” pueden contribuir ahora a la señal de detección. Sin embargo, si están disponibles o no anticuerpos libres en la mancha de prueba para unirse y detectar incluso más bacterias, no se sabe. Solo si los anticuerpos pueden detectar más bacterias, ayudará el enjuague de la LFT a mejorar el límite de detección.

Para determinar esto, se realizó una prueba de flujo continuo. En este formato de prueba, el volumen de los reactivos usados para probar en la LFT permanece constante, pero las regiones donde se produce atrapamiento, es decir, las almohadillas de muestra y conjugado se eliminaron. Si la prueba de flujo continuo ofrece una mejora en el límite de detección, se puede confirmar el atrapamiento como influyente en el rendimiento de la prueba de flujo lateral.

Tabla 5: Número de *E. coli* encontradas en diferentes secciones de la LFT durante los estudios de elución

Localización	No. total de colonias en cada sección de la prueba (número total de colonias de las 6 placas)	% colonias de muestra total
Almohadilla de muestra	75	6,25
Almohadilla de conjugado	54	4,5
Línea de prueba	26	2,17
Línea control	10	0,83
Mecha	3	0,25
Total	168	14%

Se mencionó anteriormente que el límite de detección de la LFT es 10^6 ufc/ml cuando se usan 200 μ l de suspensión de bacterias para ensayar. En 200 μ l, hay aproximadamente 10^5 ufc de *E. coli*.

5

La prueba de flujo continuo consiste en una membrana de prueba cargada con el reactivo de la mancha de prueba, que está apoyado por una almohadilla absorbente o mecha. Se carga 1 μ l del anticuerpo de la mancha de prueba en la membrana y se seca en el sitio, como se hace en una LFT regular. La almohadilla absorbente soporta la membrana (desde atrás) y ayuda a arrastrar la muestra a través de la membrana. Se hacen muestras de *E. coli* que varían en concentración de 10^8 a 10^0 ufc/ml. Se mezclan 200 μ l de cada muestra con 6 μ l de conjugado, se dejan en contacto 7 minutos, y después se cargan en la membrana de prueba. En una LFT regular, se usan 6 μ l de conjugado, y el tiempo durante el que la bacteria se pone en contacto con el conjugado antes de alcanzar la mancha de prueba, es aproximadamente 7 minutos. Esto asegura una comparación justa entre la LFT y la prueba de flujo continuo. El tiempo de contacto entre las bacterias y el conjugado en una LFT está controlado por la velocidad de absorción de la almohadilla absorbente. Esto puede ser diferente en la prueba de flujo continuo.

Se encontró que las pruebas de flujo continuo ofrecen el mismo límite de detección que las LFT, es decir 10^6 ufc/ml (10^5 ufc). Esto indica que el número de *E. coli* que realmente alcanzan la región de prueba de la LFT puede realmente ser el contenido en la muestra, y el atrapamiento que se produce no tiene influencia en el límite de detección de la LFT. Cuando se cargaron 10^4 ufc en el dispositivo de flujo continuo, no se produjo señal de prueba. Esto implica que incluso si las pérdidas en la LFT (cuando se corre con 10^5 ufc) son lo suficientemente grandes para disminuir el número de *E. coli* que alcanza la mancha de prueba hasta 10^4 ufc, no se observaría señal de prueba. Puesto que se forma una señal de

prueba en la LFT cuando se colocan 10^5 ufc en la LFT, se puede confirmar que 10^5 ufc alcanzan la mancha de prueba. Esto indica que incluso aunque se produzca atrapamiento de bacterias lo hace a un nivel limitado.

5 Este estudio se realizó en una prueba de flujo lateral fabricada usando papel estándar de industria. Cuando se usan sensores de papel mayores, o cambia el tipo de papel, el atrapamiento de bacterias/analito puede ser lo suficientemente significativo para influir negativamente en el límite de detección del sensor. Para esta prueba de flujo lateral, las pérdidas de bacterias habrían afectado solo el rendimiento de prueba si el límite de
10 detección hubiera sido menor de 1000 ufc. Por ejemplo, si el límite de detección hubiera sido 100 ufc y se hubieran cargado 100 ufc en la LFT, se podía no haber producido una señal de prueba positiva. Esto es porque el estudio de atrapamiento demostró que ± 129 ufc quedaban atrapadas en las secciones inferiores de la LFT. Por tanto, se recomienda que los desarrolladores de sensores de papel realicen un análisis tal como este para asegurar que
15 el rendimiento de la prueba no está limitado como resultado de las pérdidas de bacteria en el sensor mismo.

Por tanto, se mostró que las matrices complejas de sustratos de papel pueden reducir la cantidad de analito que realmente experimenta detección, pero puede no reducir
20 necesariamente el rendimiento de un sensor, dependiendo de su tamaño y límite de detección. Esto demuestra que los sensores de papel ofrecen buen potencial como sustratos sensores de bajo coste.

Análisis por microscopía electrónica de barrido

25 La almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, mancha de prueba y mancha control de una LFT corrida con *E. coli* 0157:H7 muertas por calor se analizaron en este estudio. También se analizaron la mancha de prueba de una prueba de flujo lateral corrida con tampón y un trozo de membrana de nitrocelulosa suministrada por el fabricante. La
30 membrana del fabricante (usada en la región de prueba de la LFT) no se expuso a *E. coli*, reactivos de bloqueo o tampón y por tanto, se denomina la “membrana sin tratar” en esta discusión.

Las diferencias estructurales entre los diferentes tipos de papel usados para fabricar la LFT
35 son aparentes. Cada tipo de papel mostraba una estructura compleja que consistía en bastones fibrosos sólidos y poros huecos. Las almohadillas de conjugado y muestra

mostraban una estructura más porosa, mientras que las fibras de membrana estaban empaquetadas más íntimamente. La membrana sin tratar demostró un residuo orgánico en su superficie, que presumiblemente resulta del proceso de fabricación. Tales membranas experimentan varios tratamientos durante la fabricación para asegurar funcionalidad óptima para aplicaciones especializadas, tal como diagnóstico médico. El residuo aparece como una combinación de estructuras esféricas y una malla fibrosa, delgada. En su superficie, estas estructuras esféricas tienen estructuras ovales incluso menores (± 330 nm) sobre ellas. La presencia del residuo hace difícil visualizar organismos de *E. coli* individuales. Sin embargo, el residuo es ligeramente mayor que un organismo de *E. coli*. Tienen un tamaño de aproximadamente 4 μm por 2 μm , comparado con una *E. coli* que tiene aproximadamente 2 μm por 0,5 μm . El residuo también se diferencia de una estructura de *E. coli* en que tiene una superficie muy irregular, áspera, de márgenes dentados, en contraste con la superficie más lisa, más regular de una *E. coli*. Basado en estas diferencias estructurales, usando MEB, se identificó *E. coli* en las distintas secciones de la LFT.

No se identificó *E. coli* en la mancha de prueba de la LFT corrida con solo tampón fosfato. Sin embargo, el residuo era aún prevalente. Esto indica que incluso enjuagando la prueba con tampón o dando vueltas suavemente la membrana en una solución de bloqueo, el residuo no se puede eliminar. Tampoco se observó *E. coli* en la membrana sin tratar, pero el residuo era aún aparente.

Durante los estudios de tinción colorimétrica, se mostró que alguna *E. coli* quedaba atrapada en las almohadillas de muestra y conjugado de la LFT y, por tanto, no alcanzan la mancha de prueba. Durante los análisis por MEB, se identificaron *E. coli* en estas regiones, más que en cualquier otra sección de la LFT. Esto podría ser debido al hecho de que las fibras en las almohadillas de muestra y conjugado están más dispersas y porosas, haciendo más fácil la visualización de los organismos individuales. También se encontraron bacterias atrapadas en otras regiones de la LFT, tal como mancha de prueba e incluso en la mancha control.

Algunas de las *E. coli* observadas en la mancha de prueba de la LFT (corrida con *E. coli*) parece haberse alojado en esta región al azar, mientras que muchas parecen estar unidas a los anticuerpos. Sin embargo, confirmar que la *E. coli* está unida a anticuerpo es difícil debido a la presencia del residuo orgánico. Las bacterias que se observaron en la región de la mancha control de la LFT parecían haberse alojado allí aleatoriamente. La mayoría de las bacterias aleatoriamente localizadas están enmarañadas entre fibras de papel o solo están en la superficie del papel. Parecen haberse colocado aquí cuando el fluido de muestra dejó

de fluir. Esto confirma la teoría de que una vez el fluido deja de fluir, el movimiento de las bacterias se detiene también. Por tanto, puede ser posible que el enjuague adicional de la prueba (una vez que la muestra entera se ha absorbido) ayudará a transportar las bacterias dejadas detrás en las almohadillas de muestra y conjugado a la mancha de prueba. Sin embargo, esto puede no mejorar el límite de detección de la LFT desarrollada, pero puede hacerlo para sensores con límites de detección menores.

Se observaron algunos agregados de *E. coli* en las almohadillas de muestra y conjugado. Estos agregados se pueden haber formado en la muestra original, antes de cargarla en la LFT. A diferencia de los organismos individuales identificados anteriormente, estos agregados realmente aparecen enmarañados o entre las fibras de celulosa. Los agregados son de tamaño grande y por tanto con gran riesgo de enmarañarse antes de entrar en contacto con la mancha de prueba. Para reducir tal agregación, la muestra se puede sonicar durante un intervalo corto antes de correrla.

La sección transversal de la almohadilla del conjugado se examinó inclinando la pletina del microscopio. Esto se hizo para confirmar que las bacterias también fluyen a través de la sección transversal del, papel, y no solo a lo largo de la superficie. Mientras se inclina la pletina, se confirmó que las fibras de celulosa eran estructuras cilíndricas sólidas. Por tanto, no hay posibilidad de que *E. coli* se pierda en la sección interna de las fibras.

Se observó *E. coli* en la sección transversal del papel. Esto implica que algo de *E. coli* no viaja a lo largo de la superficie del papel, y evita los anticuerpos. Es posible que algunos anticuerpos puedan penetrar en la sección transversal del papel. Sin embargo, incluso si estos anticuerpos se unen a las bacterias que fluyen a través de la sección transversal de la LFT, la señal se pierde ya que no se puede observar desde debajo de la superficie de la membrana. Por tanto, muchas bacterias quedan sin detectar. El gran número de *E. coli* en la sección transversal de la membrana (comparado con su superficie) indica que las bacterias pueden preferir viajar dentro de la sección transversal del papel. Esto puede deberse a la estructura muy porosa de la sección transversal, que sirve como el camino de menor resistencia.

Se analizó una imagen de los poros de la LFT corrida con *E. coli*. Se observaron muchas estructuras con forma cilíndrica/bastones en estos poros, que implica que están la sección transversal del papel. Debido a que su superficie entera no se puede ver, es difícil confirmar si estas estructuras son *E. coli*. Se observaron estructuras similares en los poros de la

membrana alrededor de la mancha control en la LFT corrida con *E. coli*. Por comparación, se analizó la mancha de prueba en la LFT corrida con tampón. No se observaron estructuras cilíndricas. Similarmente, no se encontraron ninguna de estas estructuras en la membrana sin tratar. Esto confirma que las estructuras en los poros son *E. coli*. Además, como *E. coli*, estas estructuras tienen una superficie lisa. Esto es evidencia adicional de cómo *E. coli* se transfiere a través de la sección transversal de la LFT.

La información anterior ayudará a los desarrolladores de sensores de papel rápidos a pensar en maneras de reducir la transferencia del analito a través de la sección transversal del sustrato de papel bien bloqueando partes de la sección transversal del papel, o simplemente reduciendo el espesor del papel usado. Esto asegurará que más analito está expuesto y disponible para detección en la superficie superior de la membrana, que es especialmente importante cuando se usan señales colorimétricas.

Todos los resultados anteriores confirman que se pueden transferir bacterias *E. coli* enteras a través de la LFT y lo hacen alcanzando las áreas de detección del sensor (las manchas de prueba y control). Mientras que alguna *E. coli* se pierde en la sección transversal del papel, y queda “atascada” en las almohadillas de muestra y conjugado, esto no reduce significativamente el número de *E. coli* que alcanza la mancha de prueba. Como resultado, no influye en el límite de detección del sensor desarrollado.

Detección de un organismo de *E. coli*

El preenriquecimiento o preconcentración de muestras de agua antes del análisis microbiológico es práctica común en la industria del agua. Esto es porque el recuento bacteriano en la mayoría de las fuentes de agua es demasiado bajo para que los sensores lo detecten directamente. Cuando se usan métodos de detección convencional, los periodos de enriquecimiento requeridos varían entre 18 a 24 horas para detectar un organismo. El fin de esta investigación era determinar si el preenriquecimiento de la muestra permitiría que la LFT detectara una única *E. coli*, y si es así, determinar la duración del enriquecimiento requerido. La esperanza es que el tiempo de enriquecimiento estará muy por debajo del tiempo actual requerido de 18 a 24 horas.

Una única bacteria requiere entre 20 y 30 minutos de incubación para replicarse (Spelberg et al. 2008), es decir, el tiempo requerido para que una *E. coli* se convierta en dos. Seleccionando un tiempo de replicación medio de 25 minutos, se creó una hoja de cálculo

para aproximar el tiempo de incubación requerido para que cada solución caldo-bacteria que se ensaya alcance una concentración de solución 10^7 ufc/ml. Se seleccionó una concentración de 10^7 ufc/ml ya que desarrolla una señal positiva fuerte, no ambigua en la LFT. Los resultados computados indican que se podrían necesitar $\pm 7,5$ horas de incubación para detectar la muestra de 10^2 ufc/ml, $\pm 8,75$ horas para detectar la muestra de 10^1 ufc/ml, y aproximadamente 10,42 horas para detectar la muestra de 10^0 ufc/ml. Usando estas aproximaciones, se realizó este estudio, en donde se agregó *E. coli* en tampón fosfato y se incubó. Después de 7 horas de incubación, la muestra de 10^2 ufc/ml produjo una señal de prueba positiva. Este resultado se corresponde fielmente a los cálculos computados. Después de 9 horas de incubación, la muestra de 10^1 ufc/ml produjo una señal de prueba positiva y la muestra de 10^0 ufc/ml hizo lo mismo a $T=10$ horas. Cada concentración se volvió a ensayar de una placa diferente una hora después de obtener las señales positivas. Esto se hizo para confirmar que las señales positivas eran de hecho, resultados de prueba verdaderos. La intensidad de las señales producidas por las muestras incubadas se comparó con la producida por una muestra de 10^7 ufc/ml conocida.

Se encontraron las intensidades de señal comparables y por tanto confirma que las muestras incubadas producían señales de prueba positivas verdaderas. Se confirmó que las muestras usadas para este estudio contenían 10^2 , 10^1 y 10^0 ufc/ml incubando 1 ml de cada muestra en agar durante la noche. Los resultados se enumeran en la tabla 6. Para reducir el tiempo de incubación más, se hizo un estudio en donde el volumen de caldo usado se redujo de 5 ml a 1 ml. Usando menos caldo, la concentración de bacterias inoculadas en el caldo se vuelve mayor, lo que implica que se puede requerir un periodo de incubación más corto para alcanzar 10^7 ufc/ml.

Tabla 6: Recuentos reales de *E. coli* determinados de recuento de placa

Concentración esperada basada en espectrofotometría	Concentración real obtenida
270 cfu/ml	232 cfu/ml
27 cfu/ml	19 cfu/ml
2,7 (3) cfu/ml	6 cfu/ml

Por ejemplo, cuando se usa 1 ml de caldo con 1 ml de una muestra de 10^0 ufc/ml, entonces la concentración inicial sería:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(3 \times 100)(1) = C_2(2)$$

$$C_2 = 1,5 \text{ cfu/ml}$$

Cuando se usan 5 ml de caldo, la concentración inicial de bacterias es 0,5 ufc/ml. La reducción esperada en el tiempo de incubación podría, sin embargo, estar contrarrestada por los efectos de crecimiento más lento debido a la disponibilidad de menos nutrientes por organismo. Sin embargo, como se esperaba, el tiempo de incubación se redujo de 10 horas para detectar una única *E. coli*, a 9 horas. Similarmente, se espera una hora de reducción en el tiempo de detección cuando se analizan las muestras de 10^1 y 10^2 ufc/ml.

Por tanto, las LFT tienen el potencial de aplicarse para análisis de agua potable y residual, ya que se puede detectar una única *E. coli*. Además, el tiempo requerido por las LFT para detectar una única *E. coli* es menos de la mitad del tiempo requerido por los métodos de detección convencionales. Por tanto, este sistema ofrece mejor protección para los consumidores de agua ya que se les puede avisar de suministro de agua contaminada antes, reduciendo de esta manera el riesgo de contraer enfermedades de transmisión hídrica. Empleado el uso de un lector colorimétrico de bajo coste, el tiempo para la detección se puede reducir incluso más debido a la capacidad del lector de identificar la presencia de señales antes. Estas señales más tempranas pueden ser demasiado débiles para advertirlas a simple vista.

Análisis de muestras de agua medioambiental

Para determinar si la LFT puede manejar muestras medioambientales crudas, sin procesar, se probaron muestras de efluente con cantidades variables de *E. coli* 0157:H7 agregadas en la LFT. Se añadió tampón fosfato en polvo a estas muestras. Las muestras se absorbieron en la longitud entera de la prueba sin evidencia de obstrucción. La concentración mínima de *E. coli* agregada que produjo una señal de prueba era 10^6 ufc/ml, igual que la obtenida cuando se agrega *E. coli* a agua desionizada. Esto implica que la LFT se puede usar para ensayar muestras de efluente directamente, sin la necesidad de pretratar la muestra. Además, no se encontró cualquier sustancia química que pueda estar contenida en la muestra interfiriera con la carrera de la prueba. Si en algunas ocasiones se encuentra que el efluente contiene piezas grandes de suciedad y restos, se puede requerir prefiltración.

También se analizó una muestra de entrada de agua de Tshwane. La muestra estaba principalmente libre de grandes trozos de restos ya que se recogió de un punto en la línea de entrada después de la filtración en malla. Puesto que no había experimentado

tratamiento, esta muestra contiene grandes cantidades de bacterias. La muestra se ensayó antes y después de una dilución en serie de 1 a 10 veces. La muestra se diluyó en caso de que el nivel de *E. coli* fuera tan alto que la unión competitiva en la mancha de prueba puede producir resultados falsos negativos en la LFT. Sin embargo, ninguna de las muestras, incluso antes de la dilución, produjo resultados de prueba positivos. Esto implica que los niveles de *E. coli* en la muestra pueden de hecho ser menores que el límite de detección de la prueba. Este es un descubrimiento inesperado, ya que se pensaba que la entrada contenía niveles muy altos de bacterias.

- 10 Para verificar esto, se filtraron diez volúmenes de 100 ml de la muestra de entrada, después de lo cual cada filtro se colocó en medio nutritivo y se incubó durante varias horas. Se ensayó una muestra cada hora, y después de tres horas, una señal de prueba positiva se desarrolló en la LFT. Esto indica que el recuento de *E. coli* en la entrada estaba ligeramente por debajo de 10^6 ufc/ml. Para determinar la concentración de la entrada, y por tanto
- 15 determinar exactamente por qué se necesitan 3 horas de incubación para detectarla, la muestra de entrada se ensayó usando Colilert. Se diluyó y después se ensayó, puesto que Colilert solo puede detectar ≥ 2400 ufc por 100 ml. Se encontró que la entrada contenía 10^7 ufc/100 ml, que equivale a 10^5 ufc/ml. Esto está ligeramente por debajo del límite de detección de la LFT, y explica la necesidad para la incubación de 3 horas. Esta
- 20 concentración de la entrada se confirmó por ensayo independiente en agua de Tshwane.

Como la muestra de la entrada se colocó en caldo selectivo para *E. coli* y coliformes, solo estas bacterias se podrían haber cultivado a niveles detectables en la LFT. Para asegurar que la señal de prueba positiva surgió de la detección de *E. coli* y no debido a que los anticuerpos dieran reacción cruzada con otras coliformes, se hizo lo siguiente. La muestra de la entrada se cultivó en un agar específico de *E. coli*, después de lo cual las colonias de *E. coli* se aislaron y usaron en un ELISA con los anticuerpos de la LFT. Los anticuerpos tanto del conjugado como de la mancha de prueba se unieron a las cepas medioambientales de *E. coli*, con un límite de detección de 10^6 ufc/ml. Esto confirma que la señal producida en

30 la LFT tras incubar la muestra de entrada durante 3 horas era un resultado de la unión de *E. coli*. Esto demuestra la capacidad de la LFT para detectar cepas medioambientales y serotipos de *E. coli*, diferentes de K12 y O157:H7. Esto indica la aplicabilidad de las pruebas para análisis de agua medioambiental.

- 35 También se analizó una muestra de efluente. Después de 24 horas de incubación, no se obtuvieron señales de prueba positivas cuando se usó caldo nutriente general. Mientras que

- el crecimiento era aparente (el caldo se volvió turbio), no se formaron señales de prueba positivas en la LFT. Sin embargo, cuando se usa caldo selectivo, se observó una señal de prueba positiva después de 18 horas de incubación. Según Tshwane Water, la muestra de efluente contenía ± 20 ufc/100 ml ese día particular. Basado en resultados anteriores, 20 ufc
- 5 deberían haberse detectado en ± 9 horas cuando se usa medio no selectivo. La razón por la que *E. coli* se detecta en el caldo selectivo y no en el caldo no selectivo puede ser un resultado de crecimiento competitivo. El caldo no competitivo habría fomentado el crecimiento de todas las bacterias en la muestra, incluyendo todas las bacterias no *E. coli*. Como resultado, estas bacterias no *E. coli* habrían superado a *E. coli* para nutrientes,
- 10 previniendo que se multiplicara a niveles detectables en la LFT. El efecto de hacinamiento puede haber reducido su nivel de crecimiento adicional. Como resultado, se puede requerir siempre caldo selectivo cuando se analizan muestras de efluente, solo para asegurar que *E. coli* se cultiva, y puede por tanto ser detectada.
- 15 El largo tiempo de detección requerido por el caldo selectivo, sin embargo, plantea una desventaja significativa. El largo periodo de enriquecimiento puede ser debido al hecho de que tal medio contiene aditivos que suprimen el crecimiento de algunas bacterias no diana. Estos supresores podrían estar reduciendo la velocidad de replicación de las bacterias diana.
- 20 Considerando lo anterior, se necesita ensayar la capacidad de varios medios selectivos para fomentar la replicación más rápida. De esta manera, el tiempo de enriquecimiento para detectar una única bacteria puede reducir optimistamente al obtenido cuando se analizan muestras de laboratorio. Alternativamente, se puede usar separación inmunomagnética para
- 25 extraer solo *E. coli* de una muestra de efluente. La *E. coli* extraída se puede enriquecer después en caldo nutriente no selectivo ya que no estarán presentes bacterias no *E. coli*. El medio no selectivo ayudará a reducir el tiempo total de enriquecimiento requerido para la detección. Este método está actualmente en investigación. En conclusión, la LFT tiene gran potencial para uso en la industria de seguimiento de agua. La LFT es fácil de usar e
- 30 interpretar, de bajo coste, y puede detectar las cepas comunes de *E. coli* que existen en muestras medioambientales.

Comparación con pruebas comercialmente disponibles

- 35 Se evaluó el rendimiento de Colilert, Microsnap y de pruebas de flujo lateral Cell Biolab para *E. coli* 0157:H7. Para determinar el límite de detección de estas pruebas, se prepararon

suspensiones de *E. coli* 0157:H7 que variaban de 10^8 a 10^0 ufc/ml. Las muestras se prepararon según las instrucciones del suministrador y se ensayaron. Se encontró que el límite de detección de las LFT comerciales era el mismo que el de la LFT desarrollada, es decir, 10^6 ufc/ml. Esto implica que la LFT desarrollada rinde igual de bien que una prueba de flujo lateral comercialmente disponible (y por tanto optimizada) para *E. coli* 0157:H7. Los anticuerpos usados en la LFT comercial solo se dirigen a la cepa de *E. coli*, 0157:H7, mientras que los anticuerpos de la LFT desarrollada se dirige a un grupo mucho más amplio, es decir, todos los serotipos O y K. De forma interesante, el anticuerpo más amplio alcanza el mismo límite de detección que el más específico. Cuando se prueba con *E. coli* K12, la LFT desarrollada aún ofrece un límite de detección de 10^6 ufc/ml, aunque hubo una reducción en la intensidad de las señales de prueba. Como resultado, la posibilidad de que el anticuerpo más amplio tenga una mayor afinidad por la cepa común 0157:H7 se puede descartar. Para asegurar que el límite de detección de 10^6 ufc/ml en la LFT desarrollada se mantiene cierto para todas las cepas de *E. coli*, se debe ensayar una lista más exhaustiva de cepas. No obstante, el resultado anterior es una buena indicación del rendimiento de la LFT de esta invención. Incorporando un paso de preenriquecimiento, tanto la LFT comercial como la desarrollada pueden detectar una única bacteria de *E. coli*. La LFT de Cell Biolab puede detectar 1 *E. coli* en 18 a 24 horas. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la LFT desarrollada podría detectar potencialmente una *E. coli* en menos de 15, sin embargo, se requiere trabajo adicional con muestras de agua reales antes de que esto se pueda confirmar. La LFT comercial no se puede aplicar para análisis de agua debido a su incapacidad para detectar múltiples cepas de *E. coli*, y de hecho, actualmente se comercializa solo para análisis de alimentos.

También se realizaron otros dos estudios en las pruebas de flujo lateral de Cell Biolab. Se hizo un análisis de especificidad y también se investigó la capacidad de las pruebas para detectar bacterias muertas. Para el análisis de especificidad, se usaron los diferentes tipos de bacterias enumerados en el ejemplo 1. No se observó reactividad cruzada en las LFT comerciales, incluyendo *E. coli* K12. Se encontró que las LFT desarrolladas mostraban reactividad cruzada con *Salmonella enteritidis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por tanto, la prueba de Cell Biolab demuestra ser más específica que la LFT desarrollada y esto se puede atribuir a la mayor especificidad del anticuerpo usado en estas pruebas. Este anticuerpo se dirige solo a una única cepa de *E. coli*, comparada con las múltiples cepas y serotipos a que se dirige el anticuerpo de la LFT desarrollada. Podría haber bacterias con las que la prueba de Cell Biolab diera reacción cruzada, pero esto solo se puede determinar ensayando con más tipos de bacterias.

También se probaron las LFT comerciales usando suspensiones de *E. coli* que se habían matado por calor y cloro. Se usó lejía doméstica para obtener las bacterias muertas por cloro. En la industria del agua, las bacterias muertas deben pasar inadvertidas ya que solo las bacterias vivas plantean una amenaza para los consumidores de agua. Las tiras de pruebas comerciales produjeron señales de prueba positivas cuando se probaron con las muestras de *E. coli* muertas. Por tanto, estas pruebas no pueden distinguir bacterias muertas de vivas, similar a la LFT desarrollada. Esto se debe principalmente al hecho de que cuando se convierten en metabólicamente muertas, las bacterias pueden permanecer todavía intactas o grandes fragmentos de la membrana con sus antígenos de superficie son todavía accesibles para que el anticuerpo se una. Sin embargo, ambas tiras de prueba pueden superar este problema mediante el uso del paso de preenriquecimiento.

También se analizó el rendimiento del sistema Colilert. Para ensayo de especificidad, se prepararon suspensiones de *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteritidis*. También se prepararon suspensiones de *Enterobacter cloacae* y *E. coli* 0157:H7 y sirvieron como controles positivos. La formación de pocillos amarillos en la bandeja Colilert después de 18 horas de incubación indica la presencia de coliformes en la muestra. Para indicar la presencia de *E. coli* en la muestra, estos pocillos fluorescen cuando se exponen a luz UV.

Como se esperaba las muestras de *Enterobacter cloacae* y *E. coli* produjeron pocillos amarillos en la bandeja de Colilert. Cuando se exponen a luz UV, los pocillos en la prueba de *E. coli* fluorescieron, confirmando la presencia de *E. coli*. La prueba usando suspensiones de *Salmonella enteritidis* no produjo pocillos coloreados o fluorescentes, como se esperaba. La prueba con *Pseudomonas aeruginosa* produjo resultados falsos positivos, aunque a un nivel limitado en donde solo dos pocillos se volvieron amarillos. *Pseudomonas aeruginosa* no es ni parte de la especie de *E. coli* ni del género coliforme/enterobacterias y por tanto debe pasar inadvertida en la prueba Colilert. Los pocillos en las pruebas de *Pseudomonas aeruginosa* no fluorescieron, confirmando el resultado como una prueba positiva falsa para la presencia de coliformes. El resultado falso indica la posibilidad que *Pseudomonas aeruginosa* pueda contener/secretar la enzima responsable para producir el color amarillo, B-galactosidasa. La prueba de flujo lateral desarrollada también mostró reactividad cruzada con *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, puesto que la prueba de flujo lateral no se basa en reacciones enzimáticas, la B-galactosidasa no puede ser responsable de la interacción no específica. Tras investigación adicional, se encontró que ciertas cepas y serotipos de *Pseudomonas aeruginosa* poseen la enzima B-galactosidasa

(Kong *et al.* 2005; Marne C *et al.* 1988; Rohlfling 1968). Esto explica la reactividad cruzada observada en la prueba Colilert. También se descubrió que *Pseudomonas aeruginosa* comparte antígenos de superficie comunes con ciertas cepas de *E. coli* (King *et al.*, 2008), que podría servir como una explicación para la reactividad cruzada observada en la prueba de flujo lateral. Viendo como Colilert, un método considerado un nuevo estándar para la detección de *E. coli* no está libre de reactividad cruzada, el problema de las interacciones no específicas en la LFT puede no ser perjudicial para el éxito de la prueba, si se produce a un nivel limitado. Un estudio de Luyt *et al.* (2012) indica que la especificidad de Colilert es el 92,8%, sin embargo, Colilert solo puede detectar el 56,4% de todas las cepas de *E. coli*. Como mencionan Guo *et al.* (2005), los antígenos O que son dianas y se usan para la detección por la LFT existen en la mayoría, si no en todos los tipos de *E. coli*. Esto implica que la LFT desarrollada tiene un gran potencial para detectar más del 56,4% de todas las *E. coli* encontradas en el medio ambiente. Además, si se produce reactividad cruzada con otras bacterias patógenas o relacionadas con las aguas residuales en la LFT, la intención de la prueba, identificar fuente de agua inseguras, aún se mantiene cierta.

El sistema Colilert puede detectar tan poco como 1 ufc en una muestra de 100 ml de agua, pero requiere un periodo de preenriquecimiento prolongado de 18 horas para lograr esto. Este bajo límite de detección hace el sistema Colilert adecuado para ensayo de agua, sin embargo, su largo tiempo de detección no es ideal.

La LFT de la presente invención ha demostrado su potencial para detectar 1 ufc en 9 horas, y puesto que la mayoría de las cepas medioambientales de *E. coli* poseen el antígeno O (Guo *et al.* 2005), la LFT debe detectar potencialmente más del 60% de todas las *E. coli*. El paso de preenriquecimiento de 9 horas también permite que la LFT distinga bacterias muertas de vivas.

Por último, se analizó el sistema de detección de *E. coli* Microsnap. El sistema Microsnap es bastante nuevo, y no se ha encontrado información respecto a su implementación en plantas de tratamiento de agua o autoridades de ensayo de agua medioambiental. El sistema de detección de coliformes y *E. coli* MicroSnap está principalmente diseñado para dar una evaluación rápida y semicuantitativa de *E. coli* y coliformes en muestras de alimentos (Meighan *et al.*, 2014). Por tanto, mientras que el sistema se puede aplicar para ensayo de agua, se requiere validación adicional con muestras de agua medioambiental. Hasta ahora, solo se han realizado estudios de validación usando agua embotellada con adición (Meighan *et al.*, 2014). El producto también se vende como un sistema para la cuantificación y

detección de niveles de bajos a medios tanto de *E. coli* como coliformes. Esto implica que durante estallidos bacterianos medioambientales (cuando se producen recuentos bacterianos altos), este sistema puede no ser adecuado para servir como un sistema de aviso temprano. El sistema de LFT desarrollado es adecuado para tales casos, proporcionando resultados en 15 minutos o en menos de 3 horas. El método de Microsnap de usar enzimas para detectar las especies bacterianas diana, e incluso más, correlacionar la cantidad de enzima con la cantidad de bacterias presentes, todavía es un campo en desarrollo. Se necesita validación adicional del sistema antes que se pueda implementar para ensayo de agua globalmente. Este sistema Microsnap detecta *E. coli* basado en la actividad entre la enzima B-glucoronidasa (encontrada en *E. coli*) y un sustrato bioluminógeno. El producto de la reacción se lee usando un luminómetro que correlaciona las unidades relativas de luz de la muestra con el número de unidades formadoras de colonias que contiene. El sistema se analizó para su límite de detección, especificidad (usando las bacterias enumeradas en el ejemplo 1) y su capacidad de diferenciar entre bacterias muertas y vivas. Para el último estudio, una suspensión de *E. coli* se mató poniéndola en contacto con cloro. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Resultados de la prueba Microsnap

Muestra	<i>E. coli</i> en la muestra (ufc)	Descritas (ufc)
<i>E. coli</i> K12	10^0	<10
<i>E. coli</i> K12	10^2	<100
<i>E. coli</i> K12	10^3	<5000
<i>E. coli</i> K12 muertas por cloro	10^4	<100
Tampón fosfato	0	<50
<i>Salmonella enteritidis</i>	10^3	<100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10^3	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	10^3	<20

Los resultados indican que Microsnap muestra reactividad cruzada ligera con bacterias no *E. coli*. *Salmonella* contiene la enzima diana B-glucuronidasa (Tryland et al., 1997), que explica el resultado no específico. La reactividad cruzada con *Enterobacter cloacae* se produce a un menor grado, con solo el 1% de las bacterias en la muestra original descritas que son *E. coli*. *Pseudomonas aeruginosa* no muestra reactividad cruzada. Se describió que la muestra de *E. coli* muerta por cloro contenía <100 ufc. La muestra original realmente contenía el doble de esta cantidad. Esto podría implicar que estaban presentes bacterias vivas en la

muestra ensayada, sin embargo, cuando se cultivaron en agar, no crecieron bacterias confirmando que todas las bacterias estaban muertas.

Se describió que la muestra de control negativo (tampón) contenía <50 ufc de *E. coli*. Esto se produjo en cada una de las ocasiones separadas que el sistema se probó. Se evaluó el tampón para contaminación por cultivo y se confirmó libre de *E. coli*. Es posible que los soportes de filtro usados para el estudio se puedan haber contaminado cuando se filtraron muestras ricas en *E. coli* a través de ellos. Sin embargo, esto es improbable ya que se enjuagan y lavan con etanol cada vez antes del uso. Además, si este fuera el caso, es improbable que se produjera cada vez que se realiza esta prueba, que en este caso, era en días diferentes. Cuando se ensayó con 10^0 , 10^2 y 10^3 ufc, el sistema Microsnap lo describió como tal. Por tanto, Microsnap parece capaz de detectar menos de 10 ufc en una muestra en 6-8 horas. Además, su capacidad de detectar solo *E. coli* (especificidad) y su capacidad para distinguir bacterias muertas de vivas requiere análisis adicional. Además, los resultados falsos positivos obtenidos con tampón indican que se requieren más análisis y verificación de este sistema para determinar completamente su fiabilidad e idoneidad para análisis de agua.

Tabla 8: Resumen de la comparación de sistemas

	Microsnap	LFT	Cell Biolabs	Colilert
Parámetro				
<i>Con enriquecimiento</i>				
Distingue bacterias muertas de vivas	Sí	Sí	Sí	Sí
Capacidad para detectar 1 ufc en 100 ml	Sí	Sí	Sí	Sí
Límite de detección (ufc)	1	1	1	1
Tiempo de incubación requerido (horas)	6-8	9 (potencialmente)	18-24	18-24
<i>Sin incubación</i>				
Límite de detección	N/A	10^6 ufc/ml	10^6 ufc/ml	N/A
Aplicabilidad global a ensayo de agua	Sí, si la validación con muestras medioambientales demuestra éxito	Sí, si la validación con muestras medioambientales demuestra éxito	No	Sí

Conclusión

Se ha desarrollado una prueba de flujo lateral para *E. coli*. La LFT epitomiza muchas de las características deseadas en un sistema de detección de *E. coli* moderno para seguimiento de seguridad de agua. Es de bajo coste, sencillo de operar, y los resultados los pueden interpretar trabajadores de campo semicualificados. Esto los autoriza a tomar decisiones respecto a la seguridad de las fuentes de agua, la eficacia de los procesos de tratamiento, y sirve como un método de ensayo rápido en casos de estallidos bacterianos cuando los niveles de *E. coli* se vuelven muy altos.

La prueba tiene un límite de detección de 10^6 ufc/ml, pero cuando se combina con un paso de enriquecimiento, puede detectar un único organismo. La prueba tiene el potencial para detectar una única *E. coli* en menos de la mitad del tiempo requerido por métodos convencionales. Las diferencias en el tiempo de enriquecimiento requerido para la detección de diferentes concentraciones de la bacteria pueden servir potencialmente como un método de cuantificar los resultados de la prueba. Además, el enriquecimiento también ayuda a asegurar que las LFT solo detectan bacterias vivas, un requisito importante en la industria del agua.

Mientras que existen LFT para *E. coli* enteras, muchas de ellas solo detectan una cepa específica de la bacteria, tal como la prueba Singlepath de Merck para *E. coli* 0157:H7. Como resultado, no se pueden aplicar al análisis de agua.

Ejemplo 3

Desarrollo de un sensor basado en papel para la detección de E. coli en fuentes de agua: de flujo lateral a microfluídicos basados en papel

Principio de trabajo

La figura 7 muestra una imagen del dispositivo microfluídico basado en papel desarrollado. Una muestra acuosa rica en *E. coli* entra en el dispositivo en la entrada de muestra. Esta entrada se hizo ligeramente más ancha que el resto del dispositivo, para acomodar y facilitar mezclar el tampón en polvo en la mezcla de agua. El tampón ayuda a prevenir la producción de resultados de prueba falsos positivos. Cuando la muestra entra en el dispositivo, su

velocidad de flujo se reduce (debido al área mayor de la cámara de mezclado) para permitir tiempo suficiente para que el tampón en polvo se disuelva en la mezcla. Después de mezclar, barreras de cera hidrofóbica guían la muestra hacia las zonas de detección, que consisten en los reactivos del conjugado, mancha de prueba y mancha control. La *E. coli* en la muestra primero interacciona con el conjugado y se marca por anticuerpos anti-*E. coli* de conejo etiquetados con oro. La *E. coli* marcada fluye hacia la región de estrechamiento del dispositivo, que sirve para dirigir todo el fluido de muestra sobre las regiones de mancha de prueba y control. Por tanto, esta región que se estrecha asegura que poco a nada de complejo oro-Ac-*E. coli* evita la mancha de prueba y control del dispositivo. De esta manera, no se pierden bacterias marcadas con oro (que contribuyen a la intensidad de color de la señal). La mancha de prueba contiene anticuerpos anti-*E. coli* de conejo y la mancha control contiene anticuerpos anti-conejo de cabra. Los complejos *E. coli*-oro-Ac y oro-Ac son forzados luego en la región de mancha de prueba y control del dispositivo, donde se unen en el sitio. Como resultado de la formación del sándwich Ac-*E. coli*-Ac en la mancha de prueba, se produce una señal de color rojo. Los restantes anticuerpos del conjugado son capturados después en la mancha control, formando una segunda señal de color rojo. Puesto que la muestra se absorbe continuamente a través del dispositivo, incluso después de formarse las señales en la mancha de prueba y control, sirve como un mecanismo de lavado que elimina cualquier conjugado libre que está aleatoriamente en la prueba, especialmente en las manchas de prueba y control. Esto permite la visualización más fácil de las señales de prueba. Por tanto, la presencia de una mancha de prueba y control indica un resultado de prueba positivo para *E. coli*.

Materiales

Todos los dispositivos se diseñaron usando un programa de dibujo asistido por ordenador, Design CAD 3D MAX 21. Para imprimir los diseños en papel, se usó una impresora de cera sólida Xerox Color-Qube 8870. Esta impresora opera calentando cartuchos de cera sólida basados en resina (estos sustituyen a los cartuchos de tinta encontrados en impresoras de mesa estándar) hasta que se funden y después deposita las gotitas de cera fundida en la superficie de papel. Una vez que la cera entra en contacto con el papel, se enfría rápidamente, previniendo cualquier difusión adicional de la cera en el papel. Los diseños se imprimieron en hojas de 20 cm x 20 cm de papel de cromatografía Whatman (No. 1). Se seleccionó papel de cromatografía ya que está fácilmente disponible, es relativamente económico y se puede fabricar reproduciblemente.

Para crear los canales de flujo en papel, el dispositivo impreso se coloca en una fuente de calor (sea un horno o una placa calefactora) para permitir que la cera se funda y penetre en la sección transversal del papel. Se usó un horno Ecotherm (Modelo 22, Labotec) y una placa calefactora StableTemp, DLM 51806-15, (Cole Parmer). Una vez fundida, el dispositivo se deja enfriar durante <10 s, y está entonces listo para usar. Los reactivos sensores usados para la detección de *E. coli* incluyeron los siguientes. Se usó un anticuerpo anti-*E. coli* policlonal de conejo (Thermo Fisher Scientific, EE UU) en el conjugado y se usó un anticuerpo anti-*E. coli* policlonal de conejo (ABD Serotec, RU) en la mancha de prueba. Ambos de estos anticuerpos detectan todos los antígenos “O” y “K” de la bacteria *E. coli*. Se usaron anticuerpos anti-conejo de cabra (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) en la mancha control. Se compró solución de nanopartículas de oro, con un tamaño de partícula de 40 nm y una densidad óptica (DO) de uno de Diagnostic Consulting Network (California, EE UU). Este oro se usó para marcar los anticuerpos del conjugado. Para más detalles sobre la preparación del conjugado se hace referencia al ejemplo 1. Se compró tampón fosfato en polvo de Sigma Aldrich. Se compró una solución de bloqueo de Invitrogen, y se usa para bloquear el papel para prevenir la unión no específica.

Las cepas ATCC de *E. coli* 0157:H7 fueron amablemente suministradas por Natural Resources and Environment Unit (CSIR, Sudáfrica). las bacterias se cultivaron usando agar nutriente y caldo nutriente, ambos de los cuales se compraron de Oxoid. Para determinar la concentración de bacterias de las muestras se usaron los estándares de McFarland, junto con espectrofotometría UV/VIS (Perkin Elmer). Se usó dilución en serie para preparar muestras de diferentes recuentos bacterianos para ensayos.

25 Métodos

Determinación de la anchura de línea impresa óptima

Se imprimieron líneas de diferente anchura de diseño (la anchura introducida en Design CAD), que variaba de 30 μm a 100 μm y después se fundieron en una placa calefactora a la misma temperatura y durante el mismo periodo de tiempo. Se examinó la imagen formada en el reverso o lado inferior de la superficie impresa (llamada la superficie fundida). La anchura de línea óptima es la que forma la imagen más oscura y nítida en la superficie fundida. Esto indica que la cera de la superficie impresa ha penetrado con éxito a través de la profundidad del papel. Para analizar más la penetración de la cera, se hizo un análisis de la sección transversal del papel. La anchura de línea menor que produjo penetración vertical

completa de la cera a través de la sección transversal del papel se consideró la anchura de línea óptima.

Comparación de la eficacia de fusión entre un horno y una placa calefactora

5

Se fundieron líneas impresas usando tanto un horno como una placa calefactora a temperaturas que variaban de 50°C a 250°C, en aumentos de 50°C. Las imágenes formadas en la superficie fundida a cada temperatura se compararon para cada uno de los dos procesos de fusión. Se seleccionó la fuente de calor óptima como la que forma la imagen más oscura en la superficie fundida a cada temperatura investigada.

10

Determinación de la temperatura de fusión óptima

Se fundieron líneas de diferente anchura a temperaturas que variaban de 50°C a 250°C, en aumentos de 50°C. Aunque la anchura de línea óptima ya se identificó, usar una gama de anchuras de línea ayuda a entender mejor la influencia de la temperatura en la formación de barreras. Se seleccionó la temperatura de fusión óptima después de analizar la oscuridad de la imagen formada en la superficie fundida para cada una de las temperaturas investigadas.

15

Determinación del tiempo de fusión óptimo

Se fundieron líneas impresas de anchura variable a la misma temperatura durante diferentes intervalos de tiempo que variaban de 1 minuto a 7 minutos. Se seleccionó el periodo de tiempo de fusión óptimo probando la imagen formada en la superficie fundida para cada periodo de tiempo de fusión investigado.

25

Determinar la eficacia de barreras

Se imprimieron cuadrados de 5 mm por 5 mm con diferentes anchuras de línea que variaban desde 50 µm a 1000 µm. Cada cuadrado se fundió después a 200°C durante 1 minuto en una placa calefactora para formar barreras hidrofóbicas en la sección transversal del papel. Se pipetearon 10 µl de colorante alimentario diluido en las cámaras del cuadrado impreso y se siguió cualquier fuga durante 10 minutos.

30

Desarrollo de un dispositivo microfluídico basado en papel preliminar (PBM)

35

Se fabricó un dispositivo microfluídico basado en papel preliminar basado en los resultados de los estudios de optimización descritos anteriormente. El dispositivo desarrollado no mostró signos de fuga de fluido a través de las barreras hidrofóbicas, y contuvo el fluido durante más de 30 minutos. Esto indica la formación de barreras hidrofóbicas funcionales y canales hidrofílicos funcionales. Los anticuerpos usados para desarrollar la prueba de flujo lateral (descritos en el ejemplo 1) se añadieron después al dispositivo basado en papel como sigue.

La zona del conjugado del dispositivo se bloqueó primero usando un bloqueador de membrana comercial. El exceso de bloqueador se secó con golpecitos con una toalla, y después se secó durante 1 hora a 37°C. Se añadió después el conjugado y se secó en el sitio durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se cargaron 1 µl de los anticuerpos de señal de prueba y control en sus respectivas regiones de detección y se secaron durante 30 minutos a 37°C. Después de ello, se bloquearon y secaron durante 1 hora a 37°C. Todas las concentraciones de anticuerpos se mantuvieron constantes respecto a las usadas en la prueba de flujo lateral. Antes de usar, se añadió tampón fosfato en polvo al dispositivo, que después se emparedó entre dos trozos de adhesivo plástico. El límite de detección del dispositivo PBM se determinó probándolo con varias concentraciones de *E. coli* 0157:H7.

Resultados y Discusión

Desarrollo de un dispositivo microfluídico basado en papel para detección de *E. coli* en agua

Usando una anchura de línea óptima (500 µm), un tiempo de fusión óptimo de 1 min y una temperatura de fusión óptima de 200°C, se fabricó un dispositivo PBM. Esto se demuestra en la figura 7.

Se desarrolló una escala de calibración basada en las intensidades de señal obtenidas cuando se prueban varias concentraciones de bacterias. Esta escala de color se imprimió en el dispositivo mismo, para demostrar lo simple que los resultados colorimétricos se pueden lograr.

Se probaron dispositivos PBM con suspensiones de *E. coli* que variaban de 10^8 a 10^5 ufc/ml. Se obtuvieron señales de prueba positivas de 10^8 ufc/ml a 10^6 ufc/ml. Se usó tampón fosfato como control negativo, y no se observó señal de prueba. Estos resultados son similares a los obtenidos en la prueba de flujo lateral, donde se observó un límite de detección de 10^6

ufc/ml. Esto indica que el dispositivo PBM no reduce la funcionalidad o rendimiento del mecanismo sensor optimizado en modo alguno. Sin embargo, las intensidades de las señales de prueba positivas producidas en el dispositivo PBM son más débiles que las obtenidas en la prueba de flujo lateral. Para determinar si esto se debe al cambio del tipo de papel, se hizo una prueba de flujo lateral usando papel de cromatografía como membrana de prueba. Cuando se probó con contracciones variables de *E. coli*, todavía se obtuvieron señales de prueba débiles. Tras examen cercano, se determinó que cuando las manchas de prueba y control se aplican a papel de cromatografía, se absorben en el papel más rápidamente y por tanto se difunden a un nivel mayor de lo que se produce cuando se usan membranas de nitrocelulosa regulares. Como resultado, las manchas de prueba y control aparecen de mayor tamaño, lo que implica que hay una concentración de anticuerpo disminuida por mm² de papel comparado con cuando se usa nitrocelulosa. Esto podría ser por lo que se observan manchas de prueba más débiles en papel de cromatografía. Para reducir este efecto, las barreras hidrofóbicas en la región de la mancha de prueba se pueden colocar más próximas para reducir el área disponible en el que los reactivos pueden difundir. Esto podría aumentar la concentración de anticuerpo por mm² de área de papel, y mejorar la intensidad de las señales.

La liberación del conjugado del papel de cromatografía también era mala. Una cantidad significativa del conjugado no se liberó por completo, implicando que no contribuyó a la formación de señal. Esto podría ser otra razón para la intensidad de la señal de prueba debilitada. El material de la almohadilla de conjugado usado en las LFT está hecho de fibra de vidrio y se desarrolló específicamente para liberar conjugado en pruebas de flujo lateral. De hecho, las fibras de vidrio tienen un factor de liberación de más del 90%. Se desarrolló cromatografía para realizar separaciones cromatográficas, y por tanto en lugar de liberar conjugado intentar disminuir su movimiento hacia arriba de la prueba. Aumentar el nivel de bloqueo puede ayudar a mejorar la liberación del conjugado, sin embargo, esto requiere investigación adicional.

Conclusión

Se desarrolló un dispositivo microfluídico basado en papel para la detección de *E. coli* en fuentes de agua. Debido a la naturaleza inherente del papel usado para crear este dispositivo, la intensidad de las señales de prueba obtenidas era más débil que la observada en las pruebas de flujo lateral. No obstante, el dispositivo PBM ofrecía el mismo límite de detección que la prueba de flujo lateral, es decir, 10⁶ ufc/ml.

Los estudios de fabricación demostraron que la anchura de línea original es el parámetro de fabricación más importante en crear barreras de cera eficaces. Se seleccionó una anchura de línea óptima de 500 μm , sin embargo, cualquier anchura de línea por encima de 300 μm demostró ser capaz de formar barreras de cera impermeables. El efecto de la temperatura en la eficacia de fusión solo se observó para líneas más estrechas de 300 μm , pero se cree que la temperatura también influye en líneas más anchas. Se seleccionó una temperatura de fusión óptima de 200°C, ya que dio la mejor penetración de cera para líneas estrechas. Sin embargo, si se usan líneas más anchas de 300 μm , se puede usar una temperatura de fusión más baja. Los tiempos óptimos de fusión dependen en gran parte de la temperatura de fusión. Se seleccionó un tiempo óptimo de 1 minuto cuando se usa una temperatura de fusión de 200°C. Los tiempos de fusión de más de 1 minuto no mejoraron la penetración de la cera, sin embargo, periodos de fusión más cortos disminuyen significativamente el nivel de penetración de cera. Se encontró que una placa calefactora era una fuente de calor más eficaz ya que permite el contacto directo entre la placa calefactora y la cera. La prueba de eficacia de barrera confirma que anchuras de líneas por debajo de 300 μm no pueden formar barreras hidrofóbicas impermeables en papel. Se mostró que la resolución de línea disminuye según se fabrican los dispositivos, especialmente después de las fases de fusión. Para crear un dispositivo con una dimensión deseada, se debe considerar la difusión de la cera, que podría producir líneas que son del 13% al 25% más anchas. Esta difusión también impone la distancia mínima que debe existir entre dos líneas de cera paralelas durante la fase de diseño. Además, las líneas más estrechas de 300 μm son difíciles de imprimir, debido a las capacidades de resolución de la impresora. Se mostró que temperaturas de fusión más altas y tiempos de fusión más largos pueden afectar negativamente la resolución de la línea, y no mejora significativamente la penetración vertical de la cera. Una temperatura de fusión por encima de 200°C no se puede usar para crear barreras más estrechas de 300 μm ya que la difusión lateral domina la difusión vertical. Se encontró que la orientación de las fibras en el papel influye en la difusión de la cera tanto vertical como lateralmente a través del papel, con este efecto volviéndose más pronunciado para líneas más estrechas de 300 μm . Se encontró que las líneas verticales forman barreras de cera más eficaces, incluso aunque muestran mayor difusión lateral. Por tanto, todas las fases de fabricación usadas para crear dispositivos microfluídicos basados en papel se optimizaron totalmente, y el uso de estos descubrimientos asegurará el desarrollo rápido de dispositivos diagnósticos completamente funcionales, de bajo coste.

Ejemplo 4

Análisis de muestras obtenidas de trabajos de tratamiento de aguas residuales de Tshwane (Daspoort, Sudáfrica)

5 Se recogieron muestras de los trabajos de tratamiento de aguas residuales de Daspoort (WWTW) para análisis microbiológico. Las muestras se recogieron en la salida de la balsa de sedimento (SP) secundaria y del efluente tratado (E) que existe en la planta. El laboratorio microbiológico de Daspoort ensaya el contenido en *E. coli* y coliformes del efluente a diario. El método desarrollado busca sustituir el método que usan actualmente
10 para estos análisis (filtración en membrana), con una prueba más rápida, de bajo coste y sencilla.

La muestra de la balsa de sedimento se analizó para demostrar que la LFT puede detectar cepas medioambientales comunes de *E. coli*. El agua de la balsa de sedimentos no se trata
15 con UV, pero ha experimentado algún nivel de tratamiento con cloro. Como el efluente experimenta tanto UV como dosificación con cloro, la balsa de sedimento debe contener mayores recuentos de bacterias (especialmente *E. coli*). Resultados preliminares en el CSIR indican que la balsa de sedimentos no contiene mayores recuentos de *E. coli*/coliformes, y se puede haber tratado con menos cloro que el efluente. Las muestras de la balsa de
20 sedimentos también se analizaron para determinar si se puede desarrollar una relación entre el contenido en bacterias y la dosis de cloro.

Se analizaron la balsa de sedimento y el efluente usando tres métodos (figura 14). Para evaluar si la LFT puede detectar tipos de *E. coli* que se producen tanto en el efluente como
25 en la balsa de sedimento, se realizaron “análisis de 24 horas”. Se cargaron placas Petri con muestras de efluente y balsa de sedimento (figura 14a, b), se incubaron durante 24 horas y después de ello se probaron en una LFT. Cualquier bacteria contenida en estas muestras crecería a niveles detectables en la LFT en este tiempo.

30 También se realizó una “prueba de tiempo” para determinar la duración de tiempo requerida para detectar diferentes recuentos de *E. coli* en matrices tanto del efluente (E) como de la balsa de sedimento (SP). Para hacer esto, al agua recogida de la balsa de sedimento y el efluente se le agregaron varios recuentos de *E. coli* 0157:H7 (figura 14c), se incubó durante 24 horas, tiempo durante el cual una prueba de flujo lateral se corrió cada hora. Para todos
35 estos estudios, se usó un medio selectivo para *E. coli* y coliformes (Colilert, IDEXX) para el cultivo. El caldo se hizo en tampón fosfato dibásico (pH 8,5). El caldo Colilert se vuelve

amarillo en presencia de *E. coli* y coliformes, típicamente después de 18 horas de incubación. Las LFT usadas para estos estudios se hicieron usando anticuerpos anti-*E. coli* de conejo “todo O y K” que se marcaron con el elemento indicador colorimétrico, nanooro.

5 Resultados del análisis de 24 horas

La figura 15 confirma que la LFT puede detectar los tipos/cepas de *E. coli* encontrados tanto en la balsa de sedimento como en el efluente. En el 82% de los análisis de la balsa de sedimento, se detectó *E. coli* en la LFT. En el 60% de los análisis de efluente, se detectó *E. coli*. Esto es como se esperaba ya que en WWTW Daspoort, la balsa de sedimento está antes de varios procesos de tratamiento y por tanto contendrá más *E. coli* que el efluente. El efluente, después de haber pasado a través de los trabajos de tratamiento completos, habitualmente se dice que contiene menos de 30 ufc/100 ml, y en varias ocasiones, contenía 0 ufc/100 ml (según resultados obtenidos en el laboratorio de Daspoort). Es probable que en el 40% de los casos que no se detectó *E. coli* en el efluente, el efluente contuviera 0 ufc/100 ml ese día. De hecho, durante la recogida de muestras en ciertos días, se olían vapores de cloro fuertes. Las altas concentraciones de cloro matarían cualquier bacteria contenida en el efluente. Por tanto, los resultados de LFT muestran una fuerte correlación con lo que se espera de cada tipo de muestra, y con resultados obtenidos en los laboratorios de Daspoort. En conjunto, estos resultados demuestran que el método actual es capaz de detectar tipos de *E. coli* prevalentes en agua sudafricanas.

Resultados de los estudios de tiempo

El siguiente análisis se realizó para determinar si el método y dispositivo de la presente invención pueden detectar *E. coli* en periodos de tiempo más cortos que lo que se logra actualmente. Esto se hizo agregando a muestras de aguas residuales [de la balsa de sedimento (SP) y el efluente (E)] con *E. coli* 0157:H7, con recuentos entre 10^0 y 10^5 ufc. Como control, también se agregaron estas concentraciones de *E. coli* a tampón fosfato (PB). Las muestras con agregación se incubaron y se ensayaron cada hora. Los resultados se muestran en la figura 16. La figura 16a se considera el mejor caso, en donde se muestra el tiempo más corto para detección registrado para cada concentración. La figura 16b se considera el peor caso, en donde se muestra el tiempo más largo para detección registrado para cada concentración. Las diferencias en el tiempo requerido para la detección para cada concentración se deben a compuestos que interfieren contenidos en las muestras mismas.

Estos compuestos son diferentes en diferentes días, y su impacto en el tiempo requerido para la detección se discute posteriormente.

La figura 16 demuestra cómo un aumento en el recuento de bacterias disminuye el tiempo total requerido para la detección en la LFT. También indica que el tiempo requerido para detectar un recuento de bacterias específico es independiente de la matriz de la muestra, siempre que la matriz de la muestra no contenga aditivos que puedan matar las bacterias agregadas, o impedir su crecimiento en algún modo. Como ejemplo, el recuento de 10^3 ufc en las 3 matrices (PB, SP y E) requiere $\pm 8,5$ horas para la detección en el peor de los casos. La tabla 9 resume el tiempo medio requerido para detectar diferentes recuentos de *E. coli*. Estos tiempos se promedian a través de las muestras de matrices investigadas (SP, E y PB).

Tabla 9: Tiempo de detección total requerido por LFT para detectar diferentes recuentos de bacterias

<i>Recuento de bacterias (ufc)</i>	<i>Tiempo requerido para la detección: mejor caso (h)</i>	<i>Tiempo requerido para la detección: peor caso (h)</i>
10^5	5	5
10^3	6	8,5
10^1	12	13
10^0	15	17

Los resultados de una comparación para el tiempo requerido para la detección en la LFT para el estado de la técnica actual en prueba de detección de *E. coli* (Colilert) se presentan en la figura 17. Este análisis se hizo comparando el tiempo requerido para que el caldo Colilert se volviera amarillo (indicando la presencia de *E. coli* y coliformes), con el tiempo requerido que obtener una señal de prueba positiva en la LFT. La figura 17a muestra los tiempos más cortos registrados para la detección para cada concentración bacteriana tanto en la LFT de la presente invención como en la prueba Colilert, mientras que la figura 17b indica los tiempos más largos registrados para la detección en ambas pruebas.

En el mejor de los casos (Figura 17a), la prueba de flujo lateral proporcionó resultados antes que Colilert en la mayoría de los recuentos de *E. coli* investigados. En el peor de los casos, la LFT aún supera la prueba Colilert en la mayoría de los recuentos bacterianos. Sin embargo, hubo casos en que la prueba Colilert proporcionó resultados antes. Los resultados obtenidos a altos recuentos bacterianos parecen prometedores (véase la caja en la figura

17). La LFT proporcionó resultados de prueba positivos en un periodo de tiempo significativamente más corto que la prueba Colilert, una indicación prometedora de su capacidad para servir como un sistema de aviso temprano. Un sistema de aviso temprano tal como este no existe actualmente.

5

Por tanto, los resultados de la presente prueba de flujo lateral parecen prometedores, demostrando la capacidad de la prueba para servir como un sistema de detección de *E. coli* de bajo coste, rápido y sencillo. La prueba se ha demostrado capaz de detectar cepas medioambientales de *E. coli*, y varios recuentos de la bacteria en periodos de tiempo más cortos que los alcanzables por los sistemas de detección de *E. coli* actuales.

10

Referencias

- Byrne, B., Stack, E., Gilmartin, N., & O'Kennedy, R. (2009). Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors* (Basilea, Suiza), 9(6), 4407–45. doi:10.3390/s90604407
- Dungchai, W., Chailapaku, O. y Henry, C. S. (2011). A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. *Analyst*, Vols. 136 Pg 77-82.
- Govindasamy, K., Potgieter, S., Land K., y Muzenda. E., Fabrication of Paper Based Microfluidic Devices. In: Proceedings of the World Congress on Engineering, Londres, RU, 4-6 Julio 2012.
- Guo, H., Yi, W., Shao, J., Lu, Y., Zhang, W., Song, J., & Wang, P. G. (2005). Molecular Analysis of the O-Antigen Gene Cluster of Escherichia coli O86 : B7 and Characterization of the Chain Length Determinant Gene (wzz), 71(12), 7995–8001. doi:10.1128/AEM. 71. 12. 7995.
- Hossain, S., Ozimok, C., Sicard, C., Aguirre, S., Ali, M., Li, Y. y Brennan, J. D. (2012). Multiplexed paper test strip for quantitative bacterial detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 1567.
- Jokerst, J. C., Adkins, J. A. Bisha, B., Mentele, M. M., Goodridge, L. D. y Henry, C. S. A Paper-Based Analytical Device for the colorimetric detection of foodborne pathogenic bacteria. En: Proceedings of the 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2116 (2011).
- King, J. D., Mulrooney, E. F., Vinogradov, E., Kneidinger, B., Mead, K., & Lam, J. S. (2008). IfnA from Pseudomonas aeruginosa O12 and wbuX from Escherichia coli O145 encode membrane-associated proteins and are required for expression of 2,6-dideoxy-2-acetamidino-L-galactose in lipopolysaccharide O antigen. *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1671–9. doi:10.1128/JB. 01708-07.
- Kong, K., Jayawardena, S. R., Dayaram, S., Puerto, A., Koh, C., Høiby, N., Kong, K., et al. (2005). Pseudomonas aeruginosa AmpR Is a Global Transcriptional Factor That Regulates Expression of AmpC and PoxB β and Other Virulence Factors Pseudomonas aeruginosa AmpR Is a Global Transcriptional Factor That Regulates Expression of AmpC and PoxB β -Lactamases. *American Society for Microbiology*, 49(11), pp. 4567–4575.

40

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo microfluídico para detectar la presencia de una bacteria entera en una muestra fluida, que comprende:
 - (i) un sustrato de papel; y
 - (ii) un conducto microfluídico definido por una barrera hidrofóbica en el sustrato de papel,en donde el conducto microfluídico comprende una zona de entrada, una zona de conjugado, una zona de prueba y una mecha;
en donde la zona de conjugado, comprende un anticuerpo de detección o fragmento de anticuerpo y en donde el anticuerpo de detección o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno O y/o K en la superficie de la bacteria entera, en donde el anticuerpo de detección está marcado con una molécula indicadora; y
en donde la zona de prueba comprende una primera región que comprende un anticuerpo de captura o fragmento de anticuerpo, y en donde el anticuerpo de captura o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno O y/o K en la superficie de la bacteria entera marcada con anticuerpo de detección y una segunda región que comprende un anticuerpo control o fragmento específico para la detección del anticuerpo de detección.
2. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde la presencia de una señal positiva de una muestra fluida que se ha precultivado en un caldo nutriente durante entre 5 y 6 horas es indicativa de que la muestra fluida contiene 9000 ufc o menos de bacterias enteras.
3. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde la presencia de una señal positiva de una muestra fluida que se ha precultivado en un caldo nutriente durante 15 horas es indicativa de que la muestra fluida contiene entre 1 y 9 ufc de las bacterias enteras.
4. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la bacteria entera es *E. coli*.

5. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la molécula indicadora se selecciona del grupo que consiste en una molécula cromatográfica, una molécula óptica, una molécula fluorescente, una molécula basada en transferencia de electrones, y una molécula radiomarcada.
- 5 6. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 5, en donde la molécula indicadora es una nanopartícula de oro.
7. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde el sustrato de papel es un
10 papel de cromatografía.
8. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde la barrera hidrofóbica es una barrera de cera.
- 15 9. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 8, en donde la cera define un margen que tiene una anchura de entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 1000 μm .
- 20 10. Un método para detectar bacterias enteras en una muestra fluida, el método comprende los pasos de:
 - (i) cargar la muestra fluida que comprende las bacterias enteras en la zona de entrada de la muestra de un dispositivo microfluídico de la reivindicación 1;
 - (ii) poner en contacto las bacterias enteras en la muestra fluida con el anticuerpo de
25 detección o fragmento de anticuerpo, en donde el anticuerpo de detección o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno O y/o K en la superficie de la bacteria entera, en la zona de conjugado para producir una bacteria entera marcada con anticuerpo de detección y anticuerpo de detección sin unir, en donde el anticuerpo de detección está marcado con una molécula indicadora;
 - 30 (iii) poner en contacto la bacteria entera marcada con anticuerpo de detección con el anticuerpo de captura o fragmento de anticuerpo en la primera región de la zona de prueba, en donde el anticuerpo de captura o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno O y/o K en la superficie de la bacteria entera;
 - (iv) poner en contacto el anticuerpo de detección sin unir con el anticuerpo control o
35 fragmento de anticuerpo en la segunda región de la zona de prueba; y
 - (v) detectar si se produce o no una señal positiva en la zona de prueba.

11. El método de la reivindicación 10, en donde la bacteria entera es *E. coli*.
- 5 12. El método de la reivindicación 10 u 11, que comprende además un paso de cuantificar el número de bacterias enteras en la muestra fluida precultivando la muestra fluida en un caldo nutriente y ensayando la presencia o ausencia de las bacterias enteras en el caldo nutriente durante el periodo de incubación.
- 10 13. El método de la reivindicación 12, en donde la presencia de una señal positiva entre 5 y 6 horas desde el comienzo del paso de precultivo es indicativa de que la muestra fluida contiene 9000 ufc o menos de bacterias enteras.
- 15 14. El método de la reivindicación 12, en donde la presencia de una señal positiva 15 horas desde el comienzo del paso de precultivo es indicativa de que la muestra fluida contiene entre 1 y 9 ufc de bacterias enteras.
- 20 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde la molécula indicadora se selecciona del grupo que consiste en una molécula cromatográfica, una molécula óptica, una molécula fluorescente, una molécula basada en transferencia de electrones, y una molécula radiomarcada.
16. El método de la reivindicación 15, en donde la molécula indicadora es una nanopartícula de oro.
- 25 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, que incluye además un paso de comparar la intensidad de un resultado colorimétrico en la primera región de la membrana de prueba con una escala de calibración para cuantificar de esta manera la cantidad de bacterias presentes en la muestra fluida.

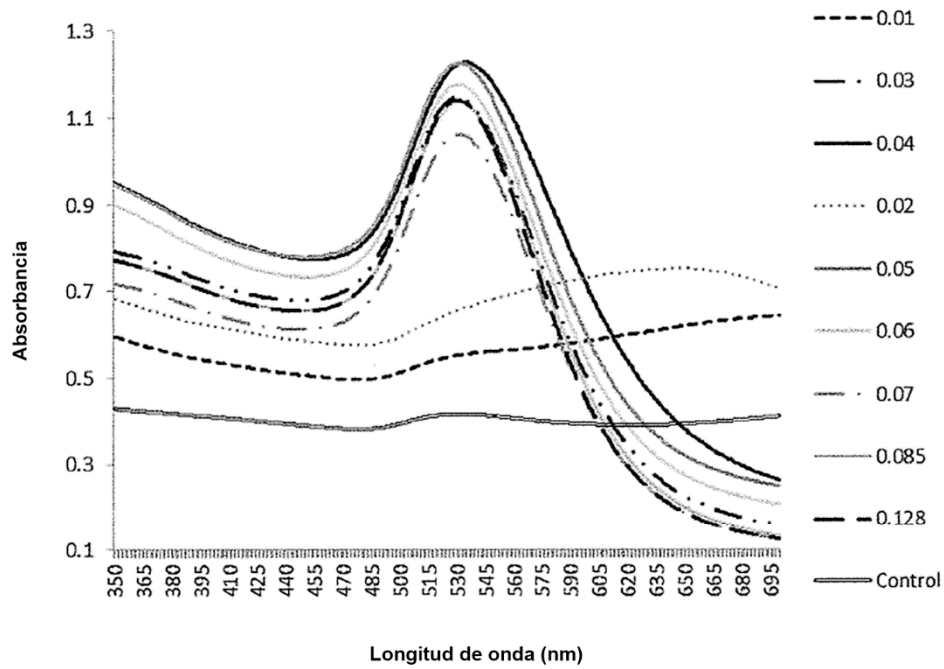


Figura 1

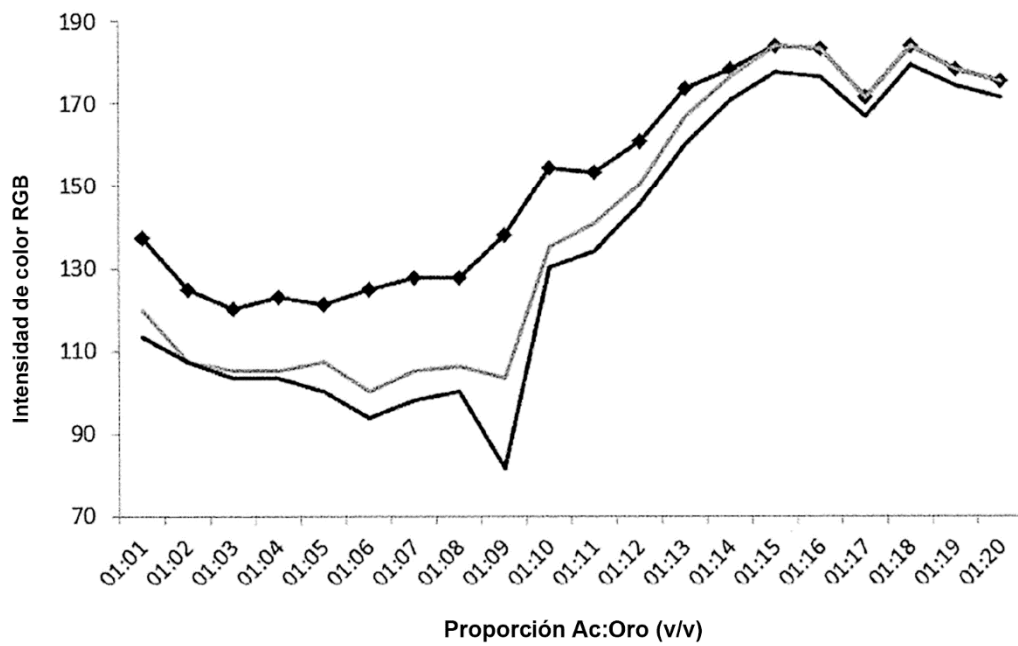


Figura 2

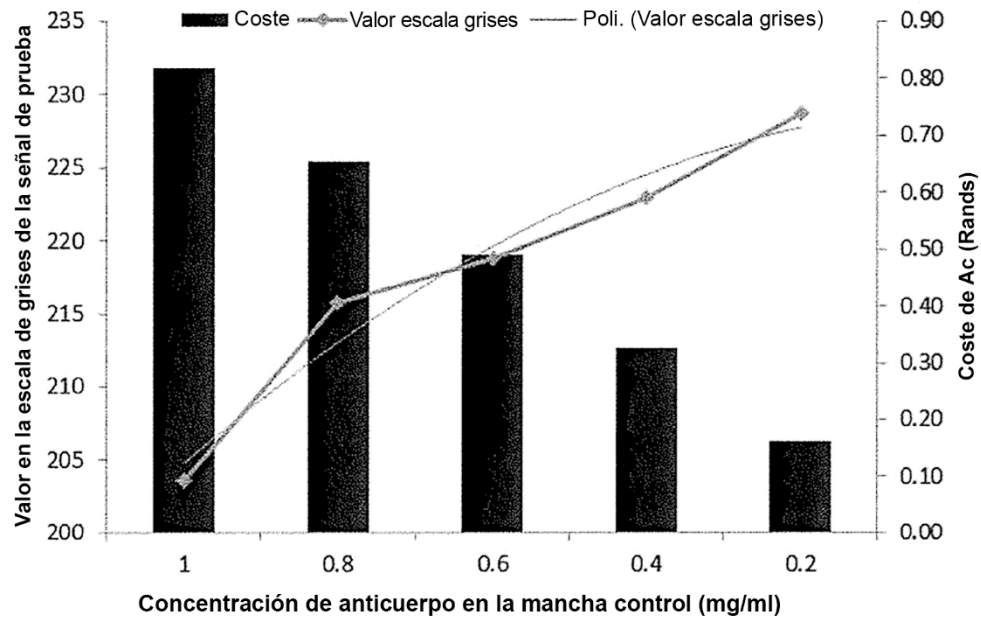


Figura 3

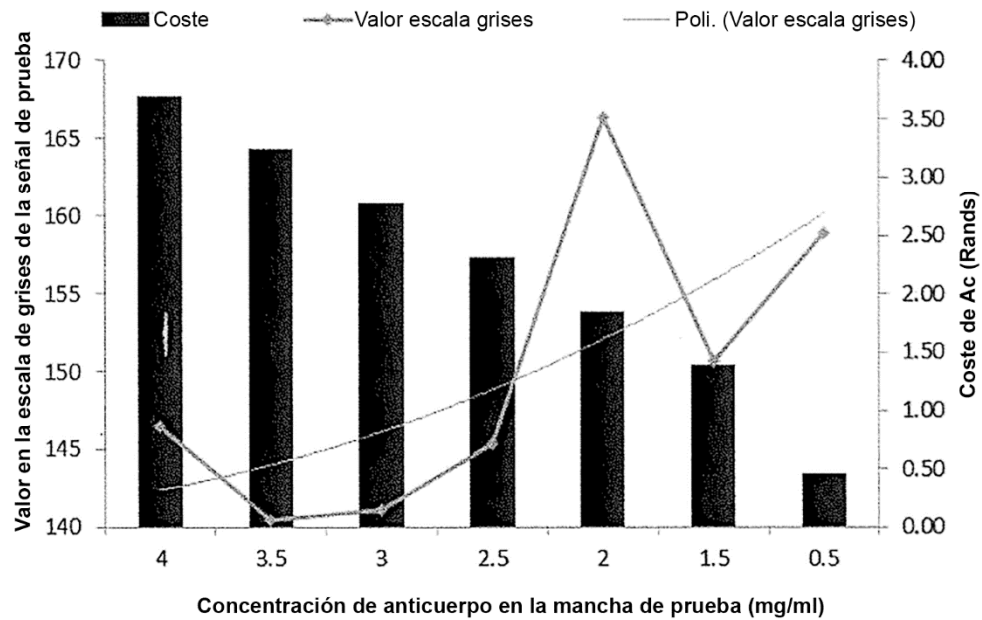


Figura 4

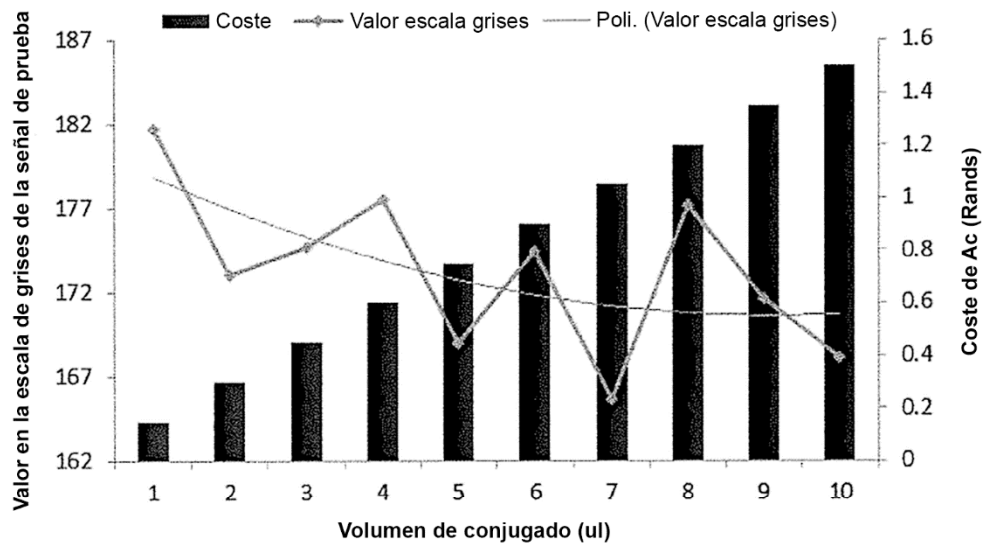


Figura 5

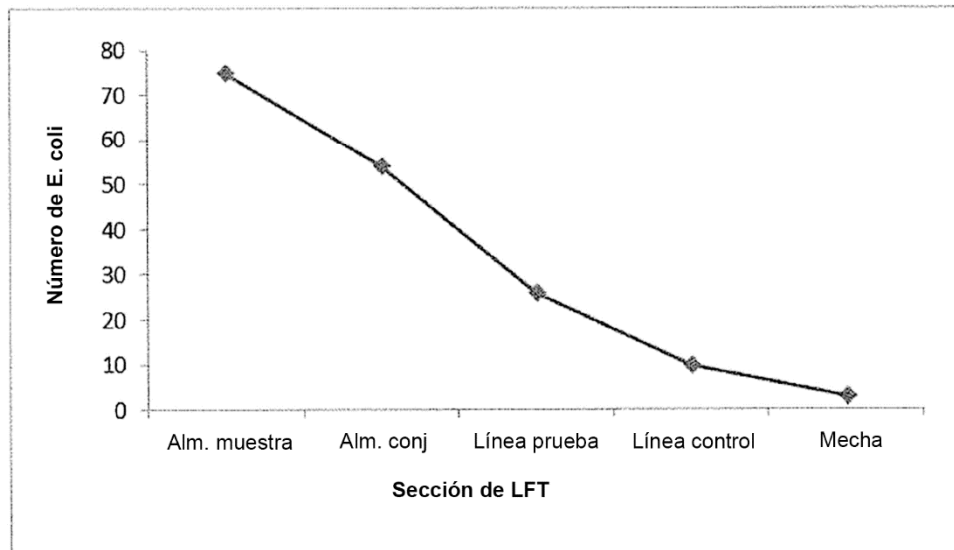


Figura 6

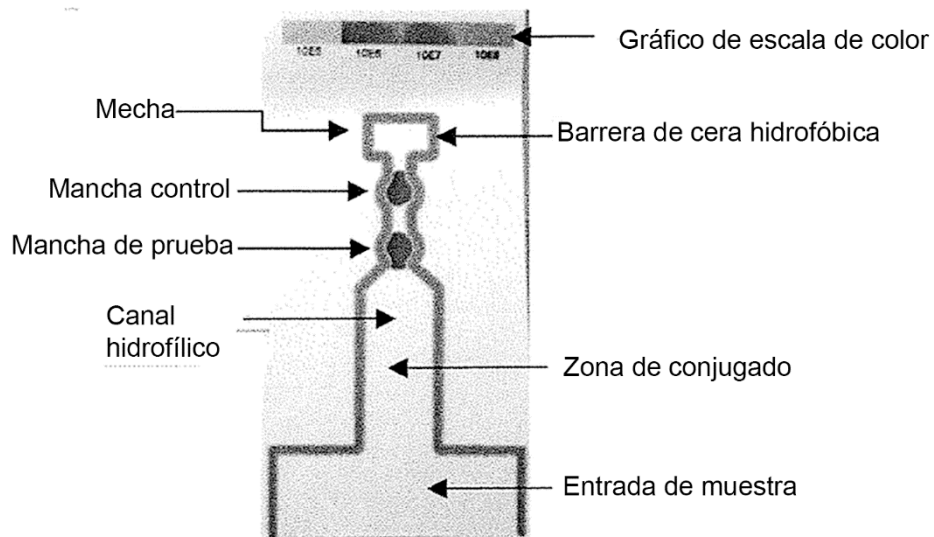


Figura 7

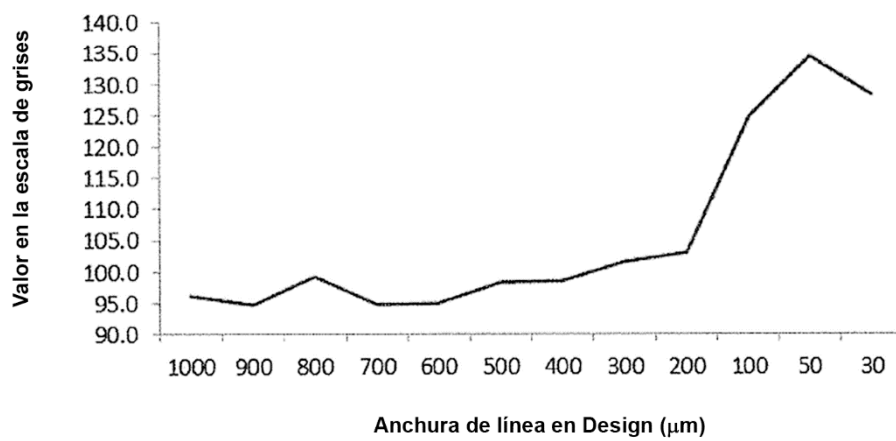


Figura 8

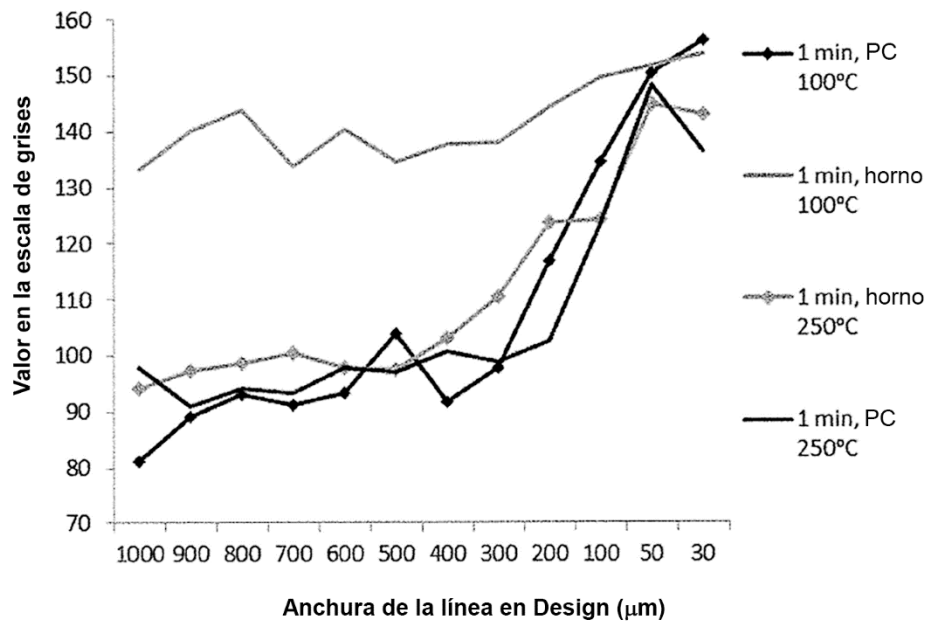


Figura 9

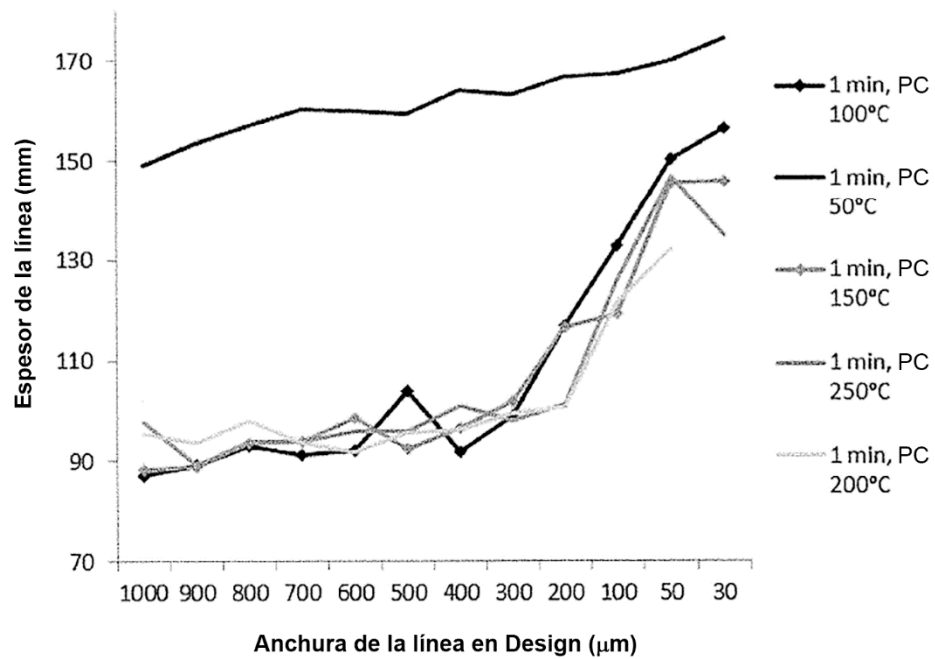


Figura 10

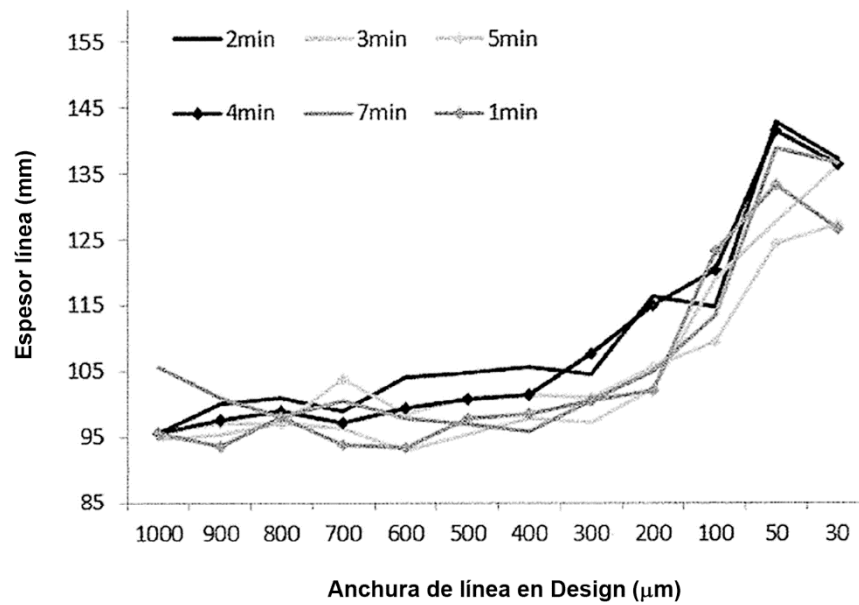


Figura 11

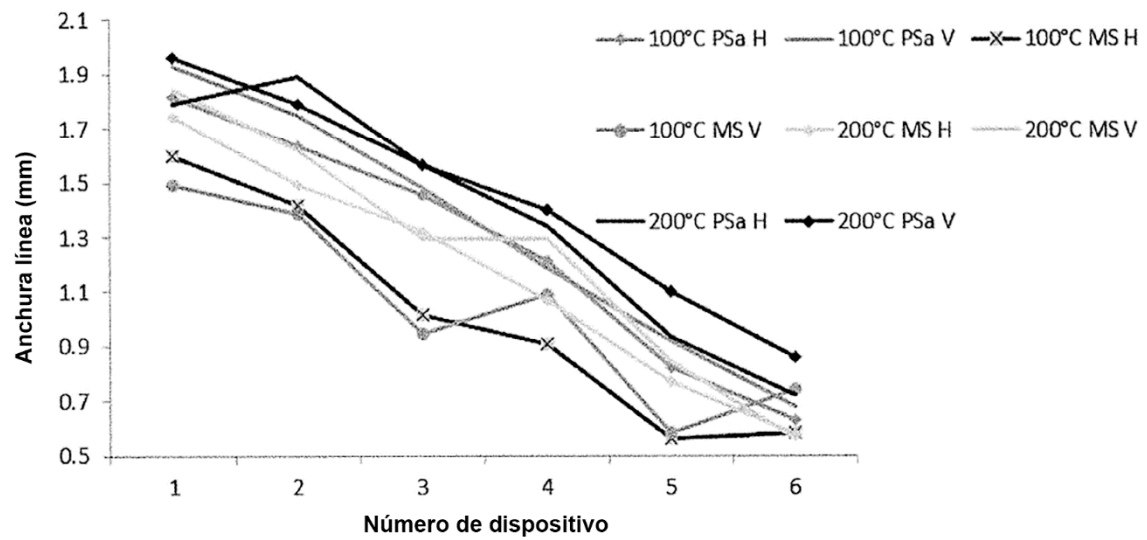


Figura 12

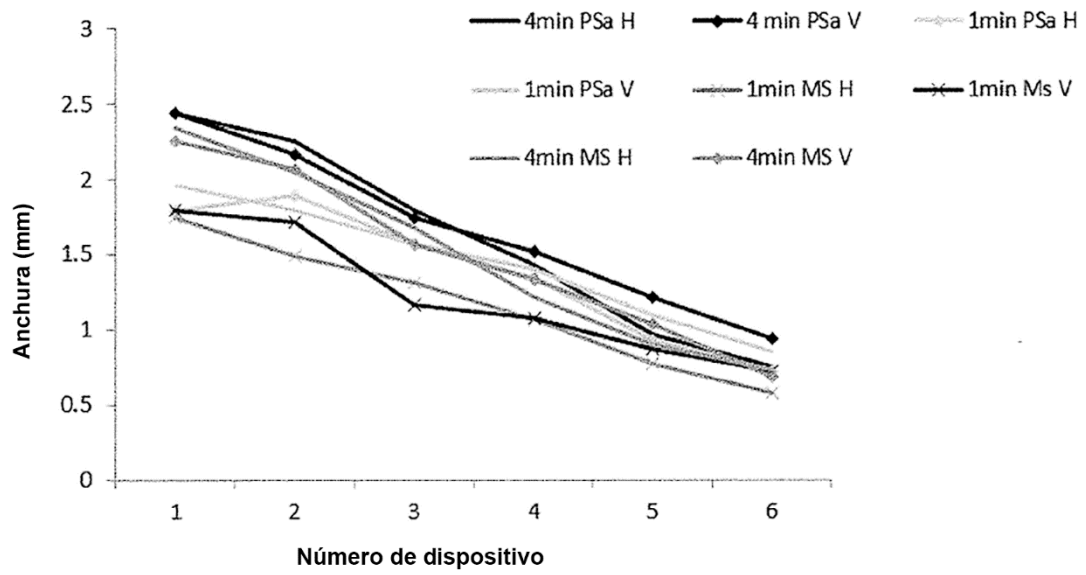


Figura 13

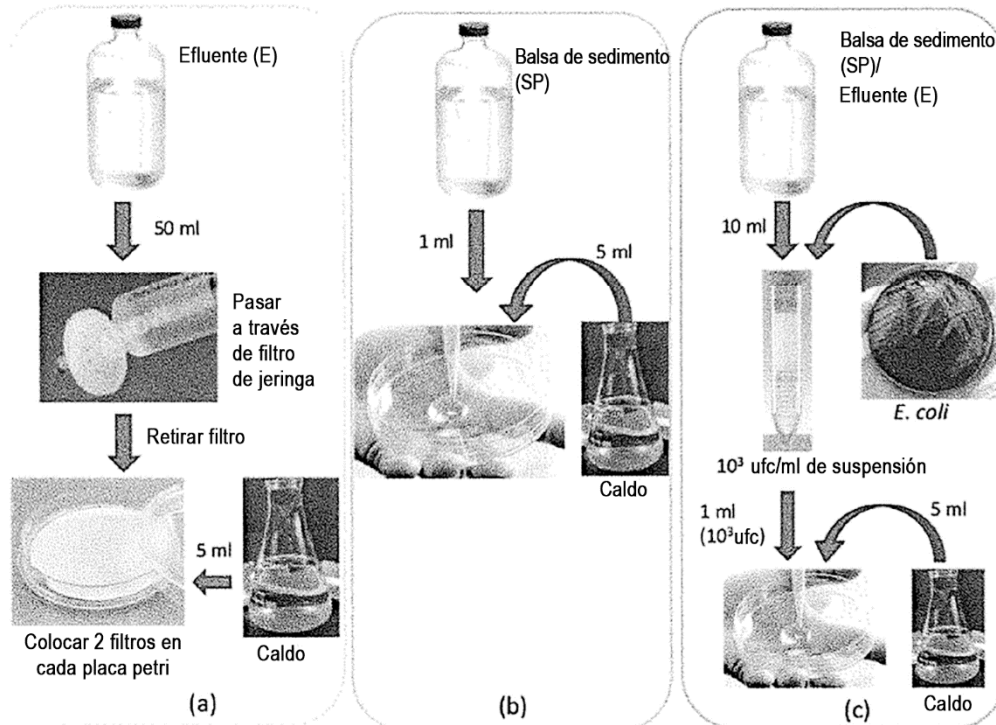


Figura 14

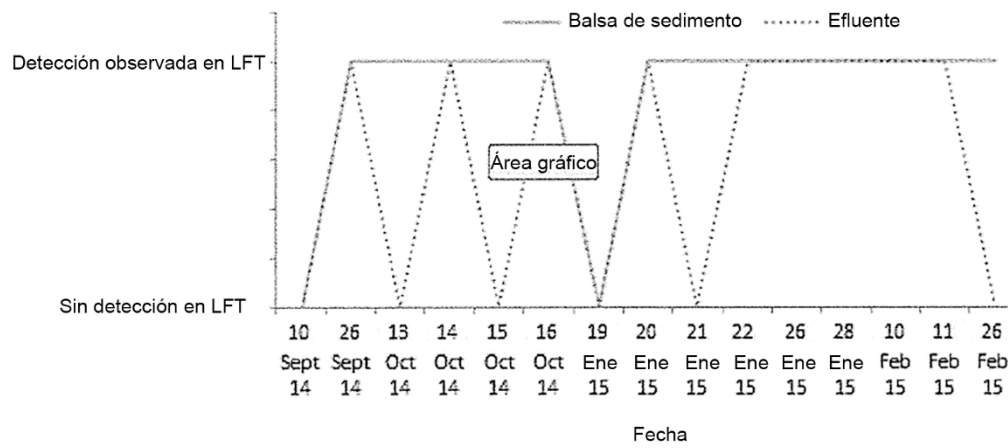
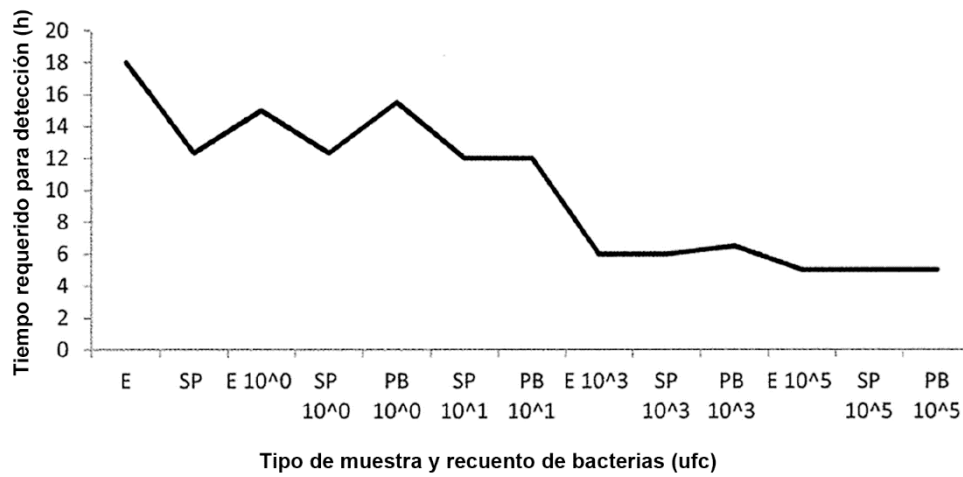
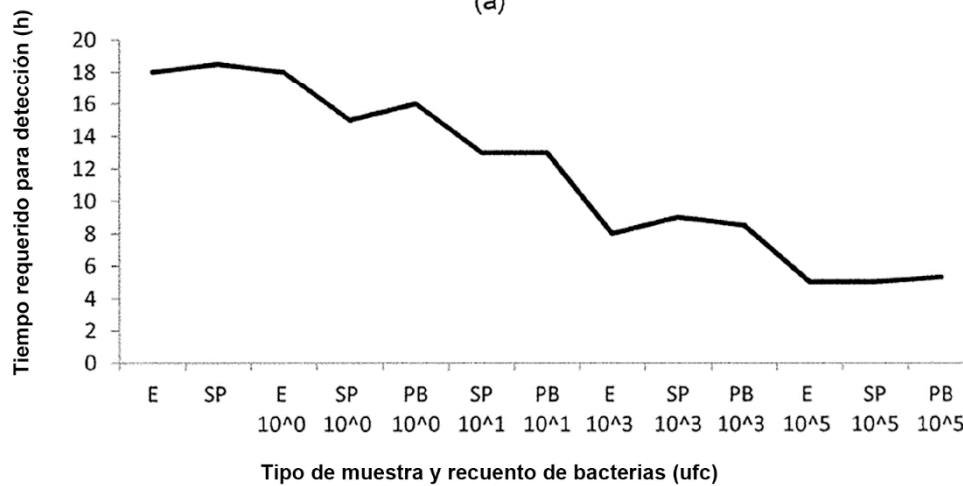


Figura 15

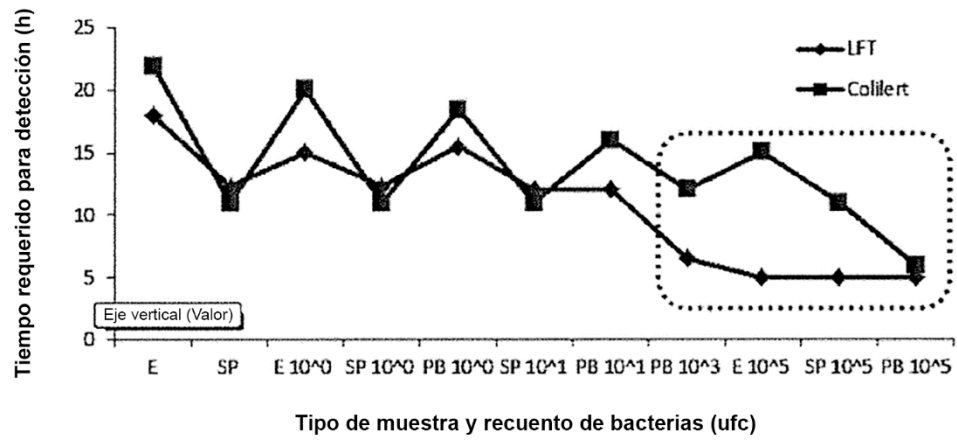


(a)

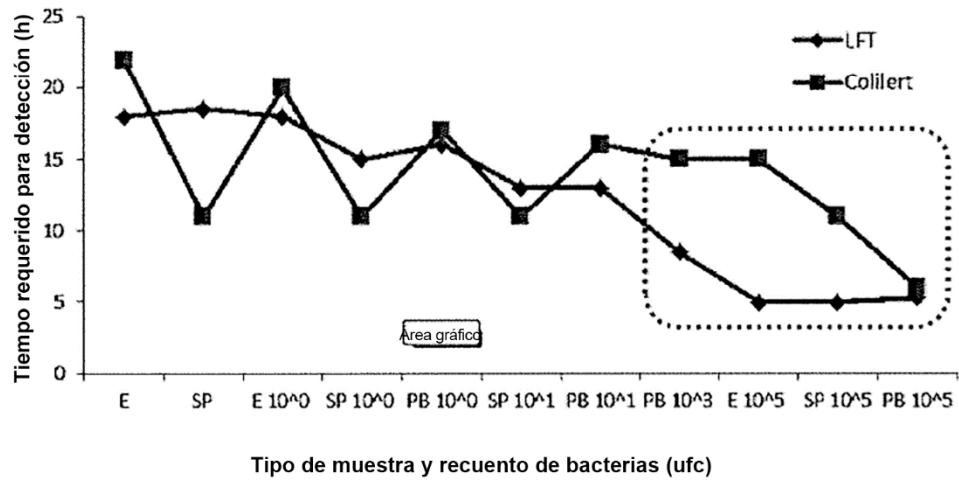


(b)

Figura 16



(a)



(b)

Figura 17