

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 203**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/US2013/027155**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13126584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13751965 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2817422**

54 Título: **Métodos y sistemas para la detección de microorganismos**

30 Prioridad:

21.02.2012 US 201261601231 P

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

28.06.2019

73 Titular/es:

**LABORATORY CORPORATION OF AMERICA
HOLDINGS (100.0%)
358 South Main Street
Burlington, North Carolina 27215, US**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, DWIGHT LYMAN;
CONRAD, ANDREW J.;
ERICKSON, STEPHEN ERIC;
GIL, JOSE S. y
HOPKINS, BEN BARRETT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 718 203 T3

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

Descripción

Métodos y sistemas para la detección de microorganismos

5 Esta solicitud reivindica prioridad respecto de la Solicitud de patente provisional USA Nº 61/601 231 presentada el 21 de febrero de 2012.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a los métodos y el uso de kits para la detección de microorganismos. El alcance de protección se define en las reivindicaciones adjuntas.

ANTECEDENTES

10 Existe un gran interés en la detección de bacterias y otros microorganismos tanto en muestras biológicas como en muestras de tipo alimentario. Los patógenos bacterianos pueden causar una importante morbilidad en los seres humanos y animales domésticos, además de grandes pérdidas económicas. Por otra parte, la detección de microorganismos tiene máxima prioridad para la Food and Drug Administration (FDA), dados los brotes de enfermedades mortales o potencialmente mortales que provoca la ingestión de alimentos contaminados por
15 determinados microorganismos, como la *Escherichia coli* o *Salmonella spp.*

Los análisis microbiológicos tradicionales para la detección de bacterias se basan en cultivos de enriquecimiento selectivos y no selectivos que se colocan en placas sobre medios selectivos para su posterior análisis que confirme la presencia de las colonias sospechosas. Estos procedimientos pueden prolongarse durante varios días. Se han investigado e introducido en la práctica diversos métodos rápidos para reducir el tiempo necesario. Sin embargo, estos métodos presentan inconvenientes. Por ejemplo, las técnicas que implican inmunoensayos directos o sondas génicas generalmente requieren un paso de enriquecimiento para obtener una sensibilidad adecuada. Las pruebas de reacción de cadena de polimerasa (PCR) también incluyen un paso de amplificación y ofrecen por tanto una alta sensibilidad y selectividad; sin embargo, el tamaño de la muestra que se puede someter de forma económica a las pruebas PCR es limitado. Con las suspensiones bacterianas diluidas, la mayoría de las pequeñas submuestras estarán libres de células y, por tanto, también se requieren pasos de enriquecimiento. El tiempo necesario para el enriquecimiento biológico viene dictado por la velocidad de crecimiento de la población bacteriana diana de la muestra, por el efecto de la matriz de la muestra y por la sensibilidad requerida. Por ejemplo, un sistema PCR por
20 captura magnética para *E. coli* verotoxigénica puede requerir unas 5, 7 y 10 horas de cultivo de enriquecimiento para detectar 1000, 100, y 1 unidad formadora de colonias por milímetro (cfu/ml), respectivamente, en un sistema modelo, y 15 horas de cultivo de enriquecimiento para detectar 1 cfu por gramo (g) en carne picada. En la práctica, la mayoría de los métodos de alta sensibilidad requieren la incubación durante la noche y tardan unas 24 horas en total. Debido al tiempo necesario para el cultivo, estos métodos pueden tardar hasta tres días, dependiendo del organismo que se pretende identificar y del origen de la muestra. Por lo general este plazo de tiempo no resulta apropiado, dado que el agua o los alimentos (u otro producto) contaminados pueden haber llegado ya al ganado o a los seres humanos. Por otra parte, el aumento de las bacterias resistentes a antibióticos y las consideraciones de biodefensa hacen que la identificación rápida de patógenos bacterianos en el agua, alimentos y muestras clínicas se haya convertido en una prioridad crítica en todo el mundo.

Así pues, existe una necesidad de contar con métodos más rápidos, simples y sensibles para la detección e identificación de microorganismos como bacterias y otros microorganismos potencialmente patógenos. Loessner et al.; Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, n.º 4, 1 de abril de 1996 (01/04/1996), páginas 1133-1140, divulga los métodos para la detección rápida y sensible de células de *Listeria* viables utilizando un bacteriófago indicador de luciferasa.

EXPOSICIÓN DE LA INVENCION

45 En un aspecto, la presente divulgación utiliza la biología de los microorganismos para la detección de un microorganismo en una muestra. Se pueden detectar diversos microorganismos utilizando los métodos descritos en el presente documento.

Por ejemplo, esta divulgación comprende métodos y sistemas que utilizan una pluralidad de ribosomas presentes en un solo microorganismo como medio para detectar la presencia de bajos niveles del microorganismo en una muestra. Por ejemplo, el método puede comprender los pasos de aislar el microorganismo de otros componentes en otra muestra, lisar el microorganismo para liberar los ribosomas presentes en el microorganismo, y detectar los ribosomas, o un componente de los ribosomas, donde la detección de los ribosomas o de un componente de los ribosomas indica que el microorganismo se encuentra presente en la muestra. En determinados ejemplos, los ribosomas y/o proteínas ribosomales liberados del microorganismo se pueden someter a ensayo utilizando un inmunoensayo amplificado con microesferas. En otros ejemplos, la presente divulgación puede comprender un ensayo de flujo lateral en combinación con nanocadenas de negro de humo para detectar ribosomas y/o proteínas ribosomales liberados por el microorganismo.

En otros aspectos adicionales y/o alternativos, la presente divulgación utiliza la alta especificidad de agentes que pueden unirse a microorganismos o a sus componentes como medio para detectar y aislar bajos niveles de un

microorganismo (por ejemplo, un único microorganismo) presentes en una muestra. Por ejemplo, en determinados ejemplos el método puede comprender los pasos de aislar al menos una bacteria de otros componentes de la muestra e infectar al menos esa bacteria con una pluralidad de bacteriófagos parentales. El método puede comprender también la lisis de al menos una bacteria infectada para liberar el bacteriófago de progenie presente en la bacteria. El método puede comprender también la detección del bacteriófago de progenie, o de un componente del bacteriófago de progenie, donde la detección del bacteriófago o de un componente del bacteriófago indica que la bacteria está presente en la muestra.

La presente divulgación también comprende métodos y sistemas que utilizan la especificidad de agentes de unión específicos, como bacteriófagos y/o anticuerpos, para aislar microorganismos de una muestra.

Otros ejemplos descritos en el presente utilizan el bacteriófago de progenie y/o bacterias etiquetadas con una fracción detectable para facilitar la detección de bacterias infectadas. Por ejemplo, el bacteriófago de progenie puede comprender una biomolécula detectable como proteína luciferasa. O bien, el bacteriófago de progenie se puede cuantificar mediante la infección de bacterias que comprenden una biomolécula marcadora como proteína luciferasa. O bien, el bacteriófago de progenie se puede cuantificar utilizando ensayos de flujo lateral conjuntamente con nanocadenas de negro de humo.

Se divulgan sistemas (por ejemplo, kits) que comprenden componentes para realizar los métodos divulgados en el presente documento.

Por tanto, los ejemplos se basan en métodos que utilizan bacteriófagos y ribosomas para la amplificación de la detección de bacterias. Los principios aplicados en el presente se pueden utilizar para la detección de otros microorganismos. Gracias al gran número de ribosomas presentes en un microorganismo o al rápido aumento del número de agentes infecciosos presentes en una célula tras la amplificación, puede resultar más fácil detectar ribosomas y/o estos agentes infecciosos de progenie que detectar los propios microorganismos. De este modo se puede conseguir una amplificación total de al menos 10 000 con una sola célula infectada.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La presente invención se puede entender mejor por referencia a las siguientes figuras de carácter no limitativo.

La Figura 1, paneles A-E, ilustra una vista esquemática de la captura con anticuerpos de células bacterianas intactas en solución.

La Figura 2 muestra un ensayo de placa de bacterias capturadas utilizando una captura con anticuerpos.

La Figura 3, paneles A y B, muestra una transferencia western blot que ilustra la captura de proteína ribosomal utilizando IgG anti-ribosomal biotinilada y microesferas magnéticas unidas a estreptavidina.

La Figura 4, paneles A y B, muestra micrografías de electrones de una célula que contiene una pluralidad de ribosomas y ribosomas purificados, respectivamente, donde el panel A muestra una micrografía de electrones de una porción (aproximadamente un tercio) de una sección fina de *Bacillus subtilis* que muestra el gran número de ribosomas (los puntos con densidad de electrones) y el panel B muestra una micrografía de electrones de tinción negativa de ribosomas de *E. coli* purificados. La célula tiene aproximadamente 1 μm de diámetro y los ribosomas tienen aproximadamente 20 nm de diámetro.

La Figura 5 ilustra un ensayo que comprende el aislamiento de una bacteria de una muestra utilizando un agente de unión inmovilizado, la lisis celular que provoca la liberación de una pluralidad de ribosomas, y un inmunoensayo de los ribosomas.

La Figura 6 ilustra un ensayo que comprende la lisis de una célula bacteriana en una muestra, el aislamiento de los ribosomas liberados por la célula usando un agente de unión inmovilizado, y un inmunoensayo tipo sandwich de los ribosomas.

La Figura 7, paneles A y B, ilustra un inmunoensayo tipo sandwich para la detección de ribosomas, bacteriófago o las proteínas que los componente, utilizando un formato de inmunoensayo estándar (panel A) o una amplificación con microesferas de la señal (panel B).

La Figura 8, en los paneles A-F, muestra una variedad de métodos de detección de proteínas ribosomales.

La Figura 9 muestra los resultados de la detección de proteínas ribosomales, donde el eje X indica el número de células bacterianas y el eje Y indica la señal respecto de un control que no contiene células bacterianas.

La figura 10, paneles A-D, ilustra el uso de un ensayo de flujo lateral para la detección de ribosomas, donde el panel A muestra una vista esquemática de una tira de flujo lateral y una ilustración de una nanocadena de negro de humo (CBNS); el panel B muestra una representación esquemática del uso de un ensayo de flujo lateral para medir ribosomas; y los paneles C y D muestran la medición de ribosomas utilizando un ensayo de flujo lateral y métodos de desarrollo alternativos.

La Figura 11 ilustra el uso de bacterias indicadoras para detectar el fago de progenie aislado de las células bacterianas.

La Figura 12, paneles A-C, muestra el uso de la detección del fago de progenie en una muestra bacteriana de interés de conformidad con realizaciones de la invención, donde el panel A muestra la detección de una o dos células bacterianas utilizando el fago de progenie, en comparación con un ensayo estándar de unidades formadoras de colonias (CFU) bacterianas; el panel B muestra el efecto de respuesta a la dosis con el ensayo de detección del fago (PFU) de la invención, también en comparación con un ensayo estándar de unidades formadoras de colonias (CFU) bacterianas; el panel C muestra la detección de células indicadoras lisadas del fago que son el equivalente a la progenie de una sola célula bacteriana (es decir, 100 fagos) o 27 células bacterianas (es decir, 2700 fagos); el panel D muestra la detección de 1, 5 y 7 células bacterianas por muestra utilizando el ensayo del fago con células bacterianas indicadoras; y el panel E muestra la detección de un elevado número (hasta 10 000 células) de células bacterianas por muestra utilizando el ensayo del fago con células indicadoras bacterianas.

La Figura 13 ilustra el uso del fago indicador con proteína de la cápside fusionada con luciferasa para detectar el fago de progenie aislado de las células bacterianas de conformidad con una realización de la invención.

La Figura 14 ilustra el uso del fago indicador con una luciferasa soluble para detectar el fago de progenie aislado de las células bacterianas de conformidad con una realización de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Salvo que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden habitualmente los expertos en la técnica. Por otra parte, salvo que así lo exija el contexto, los términos en singular incluirán los plurales y viceversa. Por lo general, las nomenclaturas utilizadas en las técnicas y en relación con los cultivos de células y tejido, la biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de ácidos nucleicos y proteínas, e hibridación descritos en el presente son aquellas conocidas habitualmente en la técnica. Generalmente las técnicas y métodos conocidos se realizan siguiendo métodos tradicionales habituales en la técnica y se describen en diversas referencias generales y más específicas que se exponen a lo largo de la presente memoria técnica, salvo que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas usadas en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio que se describen en este documento son las conocidas y utilizadas habitualmente en la técnica.

Salvo que se indique lo contrario, se entenderá que los siguientes términos tienen los significados siguientes:

A efectos del presente, los términos «un», «una», «el» y «la» se pueden referir a uno o más elementos, salvo que se indique específicamente lo contrario.

El uso del término «o» significa en el presente «y/o», salvo que se indique de forma explícita que se refiere únicamente a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y a «y/o». A efectos del presente documento, «otro» puede significar al menos un segundo o más.

En la presente solicitud, el término «aproximado» se utiliza para indicar que un valor incluye la variación de error inherente para el dispositivo, el método que se va a emplear para determinar el valor, o la variación que existe entre muestras.

El término «soporte sólido» o «soporte» significa una estructura que proporciona un sustrato al que se pueden unir biomoléculas. Por ejemplo, un soporte sólido puede ser un pocillo de ensayo (por ejemplo, una placa de microtitulación) o el soporte sólido puede ser una ubicación en un alineamiento, o un soporte móvil como una microesfera.

El término «anticuerpo» incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos sintéticos y anticuerpos quiméricos, por ejemplo, generados mediante mutagénesis combinatoria y visualización de fagos. El término «anticuerpo» también incluye miméticos o peptidomiméticos de anticuerpos. Los peptidomiméticos son compuestos basados en (u obtenidos de) péptidos y proteínas. Los peptidomiméticos de la presente invención se pueden obtener normalmente por modificación estructural de una secuencia peptídica conocida utilizando aminoácidos no naturales, restricciones conformacionales, sustituciones isostéricas y similares.

El término «agente de unión» se refiere a una molécula que se puede unir específica y selectivamente a una segunda (es decir, diferente) molécula de interés. La interacción puede ser no covalente, por ejemplo, como resultado de la formación de un enlace de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, o interacciones electrostáticas o hidrófobas, o puede ser covalente. El término «agente de unión soluble» se refiere a un agente de unión que no está asociado (es decir, unido covalente o no covalentemente) con un soporte sólido.

A efectos del presente, un «analito» se refiere a una molécula, compuesto o célula que se pretende medir. En determinadas realizaciones, el analito de interés puede interactuar con un agente de unión. A efectos del presente,

el término «analito» se puede referir a una proteína o péptido de interés. Un analito puede ser un agonista, un antagonista o un modulador. O bien, un analito puede no tener un efecto biológico. Los analitos pueden incluir pequeñas moléculas, azúcares, oligosacáridos, lípidos, péptidos, peptidomiméticos, compuestos orgánicos y similares.

5 El término «fracción detectable» o «biomolécula detectable» o «indicador» o «fracción indicadora» se refiere a una molécula que se puede medir en un ensayo cuantitativo. Por ejemplo, una fracción detectable puede comprender una enzima que se puede utilizar para convertir un sustrato en un producto que se puede medir (por ejemplo, un producto visible). O bien, una fracción detectable puede ser un radioisótopo que se puede cuantificar. O bien, una fracción detectable puede ser un fluoróforo. O bien, una fracción detectable puede ser una molécula luminiscente. O bien, se pueden utilizar otras moléculas detectables.

A efectos del presente documento, el término «zona de equivalencia» indica la región en una reacción de precipitinas en la que la concentración de antígeno y anticuerpo produce la precipitación máxima. Por tanto, si hay un exceso de antígeno o anticuerpo no se produce la precipitación.

15 A efectos del presente, «bacteriófago» o «fago» incluye uno o más de una pluralidad de virus bacterianos. En esta divulgación, los términos «bacteriófago» y «fago» incluyen virus como micobacteriofagos (por ejemplo, para TB y paraTB), micofagos (por ejemplo, para hongos), fagos para micoplasma y cualquier otro término que se refiera a un virus que puede invadir bacterias vivas, hongos, micoplasma, protozoos, levaduras y otros organismos microscópicos vivos y los utilice para replicarse. Aquí, «microscópico» significa que la dimensión mayor es de un milímetro o menos. Los bacteriófagos son virus que han evolucionado en la naturaleza para utilizar las bacterias como medio para replicarse. Un fago lo consigue uniéndose a una bacteria e inyectando su ADN (o ARN) en esa bacteria y provocando que replique el fago cientos o incluso miles de veces. Esto se denomina amplificación del fago.

25 A efectos del presente documento, un «marcador bacteriófago» es cualquier elemento biológico u orgánico que puede estar asociado con la presencia del bacteriófago. Puede ser, entre otros, el propio bacteriófago, una proteína u otra molécula incorporada a la estructura del fago, una proteína asociada con el bacteriófago, un producto génico introducido por ingeniería en el bacteriófago, ARN o ADN asociado con el bacteriófago, o cualquier porción de cualquiera de los anteriores. A efectos del presente documento, un «marcador bacteriano» es cualquier elemento biológico u orgánico que puede ser utilizado para identificar la presencia de una bacteria, como los componentes liberados cuando se lisa una bacteria con un bacteriófago, incluyendo componentes de la pared celular, ácidos nucleicos bacterianos, proteínas, enzimas, pequeñas moléculas o cualquier porción de los anteriores. Por ejemplo, en determinadas realizaciones la proteína luciferasa incorporada por ingeniería genética a un componente estructural del fago

(por ejemplo, fusión con la proteína de la cápside) o como proteína soluble es un marcador bacteriófago.

Detección de microorganismos

35 La presente invención proporciona métodos para la detección de bacterias de interés. Cada una de las realizaciones de los métodos y usos de los kits de la invención se aplican a la detección y cuantificación de bacterias de interés, incluyendo células bacterianas e incluyendo patógenos de muestras de alimentos, agua, clínicas y comerciales. Los métodos de la presente invención ofrecen una elevada sensibilidad de detección en un breve periodo de tiempo sin necesidad del enriquecimiento biológico tradicional. Por ejemplo, realizaciones de la presente invención pueden permitir la detección de un único microorganismo (por ejemplo, una célula bacteriana) en una muestra. Se divulga asimismo un método para la detección de un microorganismo de interés que comprende los pasos de: aislar el microorganismo de otros componentes de la muestra, lisar el microorganismo para liberar ribosomas presentes en el microorganismo, y detectar los ribosomas, o un componente de los ribosomas, donde la detección de los ribosomas o de un componente de los ribosomas indica que el microorganismo se encuentra presente en la muestra.

45 Se pueden detectar diversos microorganismos utilizando los métodos. En un ejemplo, el microorganismo comprende al menos una bacteria, un hongo o una levadura.

Se pueden utilizar diversos métodos para aislar el microorganismo. En un ejemplo, el paso de aislar el microorganismo comprende la unión del microorganismo a un agente de unión. Por ejemplo, el paso de aislar el microorganismo puede comprender la unión del microorganismo a un agente de unión que está unido a un soporte sólido. En una realización, el agente de unión puede ser un anticuerpo. O, cuando el microorganismo es una bacteria, el agente de unión puede ser un bacteriófago y el paso de aislamiento de la bacteria utiliza un bacteriófago específico para la bacteria.

55 Se pueden utilizar diversos métodos para detectar ribosomas del microorganismo. En un ejemplo, la detección de los ribosomas comprende el uso de un anticuerpo primario que reconoce los ribosomas y al menos un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario. O bien, la detección de los ribosomas puede comprender el uso de un anticuerpo primario que reconoce los ribosomas y al menos un segundo anticuerpo primario que reconoce los ribosomas. En ciertos ejemplos, el segundo anticuerpo primario está unido a un soporte sólido.

En otros ejemplos más, el soporte sólido comprende una pluralidad de segundos anticuerpos primarios.

En otros ejemplos, los ribosomas se pueden detectar utilizando un ensayo de flujo lateral. Por ejemplo, los ribosomas se exponen a un soporte sólido (es decir, se aplican sobre el mismo) que contiene anticuerpos anti-ribosomas y se detectan por el flujo de los ribosomas sobre la superficie del soporte. Los ribosomas unidos a la membrana que contiene anticuerpos anti-ribosomas se pueden visualizar utilizando al menos una nanocadena de negro de humo que comprende anticuerpos anti-ribosomas adicionales.

Otros ejemplos utilizan la especificidad y multiplicidad de agentes infecciosos para detectar un microorganismo de interés. Se divulga un método para detectar un microorganismo de interés que comprende los pasos siguientes:

aislar al menos un microorganismo de otros componentes de la muestra; infectar al menos un microorganismo con una pluralidad de un agente infeccioso parental; lisar al menos un microorganismo infectado para liberar agentes infecciosos de progenie presentes en el microorganismo; y detectar los agentes infecciosos de progenie, o un componente de los agentes infecciosos de progenie, donde la detección del agente infeccioso o de un componente del agente infeccioso indica que el microorganismo se encuentra presente en la muestra. En un ejemplo, el agente infeccioso parental está separado del agente infeccioso de progenie. En un ejemplo, el microorganismo es una bacteria y el agente infeccioso es un bacteriófago.

Se divulga un método para detectar un microorganismo de interés que comprende los pasos siguiente: aislar al menos una bacteria de otros componentes de la muestra, infectar al menos esa bacteria con una pluralidad de bacteriófagos parentales, lisar al menos esa bacteria infectada para liberar el bacteriófago de progenie presente en la bacteria, y detectar el bacteriófago de progenie o un componente del bacteriófago de progenie, donde la detección del bacteriófago o de un componente del bacteriófago indica que la bacteria se encuentra presente en la muestra. En un ejemplo, el bacteriófago parental está separado del bacteriófago de progenie.

El método puede comprender diversos formatos para la detección de agentes infecciosos de progenie, como por ejemplo, un bacteriófago. Por ejemplo, el agente infeccioso de progenie puede comprender una fracción indicadora. La fracción indicadora del agente infeccioso de progenie puede comprender luciferasa fusionada con una proteína estructural (por ejemplo, proteína de la cápside del fago). La fracción indicadora del agente infeccioso de progenie puede ser una fracción detectable que se expresa durante la replicación del agente infeccioso, por ejemplo, entre otros, una proteína luciferasa soluble. En un ejemplo alternativo, el método puede comprender el paso de infectar un microorganismo indicador con el agente infeccioso de progenie, donde el microorganismo indicador puede comprender una proteína que se libera tras la lisis del microorganismo indicador. En un ejemplo, la liberación de proteína del microorganismo indicador comprende una fracción detectable. Por ejemplo, la proteína liberada es una proteína luciferasa. En un ejemplo alternativo, el agente infeccioso de progenie de las células indicadoras y/o de las células de muestra infectadas se puede detectar por un ensayo de flujo lateral con nanocadenas de negro de humo.

O bien, la proteína liberada por el microorganismo indicador puede comprender ribosomas. De este modo, el método combina la amplificación que proporciona la infección con un agente infeccioso (por ejemplo, bacteriófago) con la amplificación que proporciona la detección del ribosoma.

Aislamiento del microorganismo

En ciertos ejemplos, la presente divulgación utiliza la alta especificidad de agentes que se pueden unir a un microorganismo de interés como medio para detectar bajos niveles de un microorganismo (por ejemplo, un único microorganismo) presente en una muestra. Por ejemplo, la presente divulgación comprende métodos y sistemas que utilizan la especificidad de un agente infeccioso para el aislamiento de un microorganismo de una muestra. Por ejemplo, el bacteriófago se puede utilizar para aislar bacterias.

O bien, la divulgación puede utilizar anticuerpos que son específicos para el microorganismo. Una vez aislado, por ejemplo por interacción con un anticuerpo, agente infeccioso u otro agente de unión, el microorganismo puede ser lisado para el ensayo de ribosomas y/o agentes infecciosos de progenie tal y como se describe en el presente.

Por tanto, el paso de aislar el microorganismo comprende la unión del microorganismo a un agente de unión que reconoce el microorganismo y que, por tanto, es utilizado para separar el microorganismo del resto de la muestra. Los métodos descritos en el presente documento pueden servir como medio para detectar y aislar bajos niveles de un microorganismo (por ejemplo, un único microorganismo) presente en una muestra. Por ejemplo, una única bacteria, que puede tener un volumen de menos de un micrómetro cúbico, se puede aislar de una muestra de un mililitro que tiene un volumen de 10^{12} micrómetros cúbicos.

Se divulgan métodos y sistemas que utilizan la especificidad de los anticuerpos para el aislamiento rápido y sensible de una única célula bacteriana de una muestra. El método puede incluir el paso de poner en contacto la muestra con una pluralidad de anticuerpos presentados frente a la célula intacta. Los anticuerpos se pueden purificar por afinidad.

Adicional y/o alternativamente, los anticuerpos puede ser marcados con biotina. El método puede comprender también que los anticuerpos se unan a la bacteria. En caso de que el anticuerpo esté marcado con biotina, el método puede consistir también en poner en contacto la muestra con una pluralidad de microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina para que se unan al complejo bacteria-anticuerpo, y en aislar el complejo microesferas-anticuerpo-bacteria con un imán. También se pueden utilizar otros métodos de purificación del complejo biotina-anticuerpo:bacteria. Con este método, una bacteria en una muestra de un mililitro se puede concentrar hasta aproximadamente un microlitro (unas -1000 veces), facilitando así la detección y/o cuantificación por métodos

descritos en el presente documento. Por ejemplo, una vez aislada la bacteria puede ser lisada para el ensayo de ribosomas tal y como se describe detalladamente en el presente documento.

También se divulgan métodos y sistemas que utilizan la especificidad de agentes infecciosos (por ejemplo, virus específicos para un microorganismo) para el aislamiento rápido y sensible de un único microorganismo de una muestra. Por tanto, el método puede incluir poner en contacto la muestra con una pluralidad del agente infeccioso específico (por ejemplo, un bacteriófago aislado de células bacterianas) unido a un soporte sólido (por ejemplo, una microesfera magnética) y permitir que los complejos bacteriófago-soporte sólido detecten la bacteria, se unan a ella y la infecten. Posteriormente, el complejo soporte sólido-bacteriófago-bacteria puede ser aislado antes de la lisis.

Así pues, el fago biotinilado puede ser utilizado para infectar bacterias en una muestra. El fago biotinilado puede ser inmovilizado en un soporte sólido recubierto de estreptavidina.

En otros ejemplos, el agente infeccioso (por ejemplo, el bacteriófago) puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido utilizando un anticuerpo que se une específicamente al agente infeccioso (por ejemplo, al bacteriófago o a una estructura del bacteriófago, como la cabeza).

Posteriormente, el bacteriófago introducido inmovilizado, algunos de los cuales se unen a envolturas celulares bacterianas tras la lisis celular, puede ser retirado de la muestra por aislamiento del soporte sólido. Por ejemplo, el soporte sólido es una microesfera magnética y el fago unido a la microesfera se puede aislar utilizando un imán.

O bien, el fago introducido biotinilado puede ser aislado por la posterior purificación de la bacteria y/o el fago de progenie. Por ejemplo, el lisado de la infección se puede pasar por una columna de estreptavidina; el fago biotinilado (introducido) parental se unirá a la columna, mientras que el fago de progenie, que no está biotinilado, se encontrará en la fracción que ha fluido. De este modo, el bacteriófago introducido no interfiere con la enumeración de la progenie del fago producido en la infección.

Por ejemplo, el método puede incluir los pasos de recoger el microorganismo (por ejemplo, la bacteria), por ejemplo filtrando una muestra a través de un filtro bacteriológico (por ejemplo, un filtro de centrifugación con un tamaño de poro de 0,45 µm). O bien, se pueden emplear otros métodos de aislamiento físico de los microorganismos de la muestra. El método puede comprender también la infección de la bacteria aislada con el bacteriófago, por ejemplo a una elevada multiplicidad de infección (MOI), y donde el bacteriófago comprende una fracción de unión (por ejemplo, biotina u otro agente de unión). El método también puede comprender la eliminación de al menos la mayor parte del exceso de fago introducido no adsorbido, por ejemplo lavando ese fago no adsorbido a través del filtro utilizado para capturar la bacteria.

Utilizando un fago que está unido a un agente de unión/soporte sólido para aislar las bacterias, los métodos pueden superar problemas asociados a la distinción del fago utilizado para recuperar (aislar) las bacterias (es decir, el fago introducido para infectar unido a un agente de unión o a un soporte sólido) del fago de progenie (que no está unido a un agente de unión ni soporte sólido). Un enfoque previo para este problema ha consistido en destruir el fago extracelular no adsorbido restante por medios químicos una vez infectadas las células diana. Sin embargo, el tratamiento químico puede matar las células patógenas antes de que sean capaces de producir nuevas partículas del fago. Por otra parte, tener una gran densidad del fago introducido para la infección unido por unidad de superficie de un soporte sólido elimina el potencial problema asociado con multiplicidades de infección (MOI) muy elevadas que pueden lisar bacterias sin la producción de partículas de progenie, un proceso conocido como «lisis desde fuera».

El bacteriófago puede ser inmovilizado sobre un sustrato a través de uno de los múltiples procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo específico para el bacteriófago para unir un bacteriófago a un sustrato. Alternativamente, se pueden utilizar ligandos como avidina, estreptavidina y biotina. También se pueden utilizar métodos de enlaces covalentes para unir un bacteriófago a un sustrato. Por lo general, no se deberían utilizar anticuerpos con especificidad para las proteínas de cola del bacteriófago, puesto que la unión de este anticuerpo a las proteínas de cola puede interferir con la capacidad de la partícula del bacteriófago para unirse a una célula bacteriana hospedadora.

Un ejemplo de una ilustración del aislamiento de un microorganismo se ofrece en la Figura 1, en los paneles A-E. Por tanto, tal y como se ilustra en la Figura 1, una muestra que comprende una pluralidad de bacterias, por ejemplo la bacteria-X y la bacteria-Y, 22 y 24, respectivamente, se puede exponer a un anticuerpo específico para la bacteria-X, por ejemplo un anticuerpo anti-bacteria-X 20 como el mostrado en la Figura 1A. El anticuerpo forma un complejo con un agente de unión, como biotina 21. Tras la unión de la bacteria-X 22 con el anticuerpo 20, el complejo se puede exponer a microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina 26 (Figura 1B). La biotina sobre el anticuerpo puede reconocer la estreptavidina que recubre la microesfera magnética (Figura 1C). Alternativamente, cuando el anticuerpo primario no está biotinilado, se puede utilizar una microesfera recubierta con un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo anti-bacteria-X para recubrir las microesferas magnéticas. O bien, se puede utilizar una microesfera recubierta con Proteína A y/o Proteína G que reconoce el anticuerpo anti-bacteria. En este punto, se pueden aislar las bacterias unidas a las microesferas. La eficacia de la captura se puede cuantificar poniendo sobre una placa las bacterias unidas a las microesferas 32 y la fracción supernatante no unida 30 (Figura 1D) y contando las colonias resultantes 34 (Figura 1E).

La Figura 2 ilustra un experimento de ejemplo de captura específica de *E. coli* pero no de *S. typhimurim*, en las muestras a través del uso de anticuerpos producidos contra *E. coli* intacta. Los recuentos de colonias se muestran abajo a izquierda/derecha de cada placa. En este experimento, las microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina se utilizaron para aislar un complejo de *E. coli* unido a anticuerpos policlonales (de conejo) biotinilados. Se descubrió que la *E. coli* solo estaba presente en la fracción de las microesferas cuando había anticuerpos específicos para *E. coli*, y que no se había recuperado ninguna bacteria en la fracción del supernatante (no unida). Por el contrario, la *S. typhimurium* se encontró principalmente en la fracción del supernatante cuando se utilizaron anticuerpos específicos de *E. coli*. En ausencia de anticuerpo, los dos tipos de bacterias se encontraron principalmente en la fracción del supernatante.

Las Figuras 3A y 3B muestran datos de una transferencia western blot de captura de proteína ribosomal en un lisado de bacterias (*E. coli*) que contenía ribosomas disociados con 6M tiocianato de guanidina y diluidos hasta 0,6 M de tiocianato de guanidina. La Figura 3A muestra que los anticuerpos anti-ribosomas (IgG) marcados con microesferas de estreptavidina y biotina son capaces de capturar las proteínas ribosomales de la solución. Se puede observar que cuando no se añade ningún anticuerpo anti-ribosoma (IgG = 0), no se detectan proteínas ribosomales («Ribo prot»). También se puede observar que 50 ng de anticuerpos son capaces de unirse a todas las proteínas ribosomales de 100 000 células.

La figura 3B demuestra que la adición de anticuerpos anti-ribosoma biotinilados y microesferas de estreptavidina es suficiente para capturar cuantitativamente todos los ribosomas presentes en la solución. En este experimento, el lisado de células de *E. coli* en 0,6 M de solución tampón fosfato de tiocianato de guanidina se incubó con o sin 200 ng de IgG anti-ribosoma biotinilado de conejo. A continuación, se añadieron microesferas magnéticas de estreptavidina (SA) para capturar los complejos de proteínas anticuerpo-ribosomal. El supernatante no unido se retiró de la fracción de las microesferas y se recapturó («recapt») utilizando 200 ng de anticuerpo biotinilado y microesferas magnéticas de SA. La ausencia de proteínas ribosomales en el experimento de recaptura con lisado en el que las proteínas ribosomales se habían capturado previamente indica que el primer paso de captura fue suficiente para capturar todas las proteínas ribosomales.

Amplificación de señal basada en ribosomas

Se divulgan métodos y sistemas que utilizan la pluralidad de ribosomas presentes en un único microorganismo como medio para detectar la presencia de bajos niveles del microorganismo en una muestra. El método se utiliza para someter a ensayo las células bacterianas. Sin embargo, tal y como se divulga en el presente, los métodos pueden ser utilizados para medir otros tipos de microbios que contienen ribosomas como, entre otros, hongos, micoplasmas, protozoos, levaduras y otros organismos vivos microscópicos. Por tanto, en ciertos ejemplos, la liberación, identificación y cuantificación de ribosomas se utilizan para amplificar la señal de una célula patógena en una muestra natural, comercial o clínica.

Los ribosomas son partículas de proteínas-ribonucleicas compactas que constan de dos subunidades compuestas de proteínas que contienen todos los aminoácidos y ARN ribosomales (ARNr). Los ribosomas de bacterias, arqueas y eucariotas tienen diferentes estructuras, proteínas y secuencias de ARNr. Los ribosomas se pueden describir por lo que respecta a su tasa de sedimentación. Por lo general los ribosomas bacterianos tienen una tasa de sedimentación de unos 70S, mientras que los ribosomas eucariotas de unos 80S. Los ribosomas bacterianos 70S tienen dos subunidades con tasas de sedimentación de unos 50S y 30S, mientras que las subunidades de ribosomas eucariotas 80S tienen unas tasas de sedimentación de unos 60S y 40S.

La Figura 4A muestra una micrografía de electrones de una sección fina de una bacteria *Bacillus subtilis*, que ilustra el gran número de ribosomas (puntos densos en electrones). La célula mostrada tiene aproximadamente 1 μm de diámetro y los ribosomas tienen aproximadamente -0,02 μm (20 nm) de diámetro.

Solo se muestra aproximadamente un tercio de la longitud de la célula. Por ejemplo, las células de bacterias, como *E. coli*, contienen típicamente unos 20 000 ribosomas por célula, lo que representa aproximadamente entre un tercio y un cuarto de la masa de la proteína bacteriana. Por tanto, la detección de ribosomas bacterianos liberados tras la lisis celular puede proporcionar una amplificación natural de aproximadamente 20 000 más que la amplificación de una única célula bacteriana cultivable. Para producir la misma amplificación de células bacterianas completas mediante cultivo y procedimientos de enriquecimiento estándar se pueden necesitar siete horas o más de incubación, dependiendo de la tasa de crecimiento de la bacteria particular.

En la Figura 4B se muestra una micrografía de electrones de tinción negativa de ribosomas purificados de *E. coli*. Aunque que el aparato de traducción de ribosomas de las bacterias se conserva bastante bien, puede existir una diferencia suficiente en los epítomos de los ribosomas intactos o proteínas ribosomales aisladas para distinguir entre bacterias gramnegativas y grampositivas, por ejemplo los anticuerpos anti-ribosomas de *E. coli* no reconocen ni capturan proteínas ribosomales de *Staphylococcus epidermidis*. Se pueden explotar ligeras diferencias en los epítomos de los ribosomas intactos de diferentes especies, por ejemplo mediante la absorción de sueros.

Para el ensayo de ribosomas intactos, las células concentradas se pueden generalmente lisar con una mezcla de enzima-detergente para liberar los ribosomas. Los ribosomas se pueden aislar añadiendo anticuerpos biotinilados específicos para el ribosoma y capturando el complejo ribosoma-anticuerpo con microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina, tal y como se describe en el presente documento. La presencia de ribosomas indica la

presencia de bacterias específicas para los anticuerpos utilizados en la concentración de células, y la ausencia de ribosomas indica la ausencia de bacterias específicas para los anticuerpos utilizados en la concentración de células.

Se divulga un método para la detección de un microorganismo de interés que comprende los pasos de: aislar el microorganismo de otros componentes de la muestra, lisar el microorganismo para liberar ribosomas presentes en el microorganismo, y detectar los ribosomas, o un componente de los ribosomas, donde la detección de los ribosomas o de un componente de los ribosomas indica que el microorganismo se encuentra presente en la muestra. El paso de aislar el microorganismo puede comprender la unión del microorganismo a un agente de unión que reconoce el microorganismo y que, por tanto, es utilizado para separar el microorganismo del resto de la muestra. Por ejemplo, el paso de aislamiento del microorganismo puede comprender la unión del microorganismo a un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fago) que se une a un soporte sólido o que comprende un agente de unión (por ejemplo, biotina) que reconoce un segundo agente (por ejemplo, estreptavidina o un segundo anticuerpo) unido a un soporte sólido. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales o policlonales purificados por afinidad que reconocen proteínas ribosomales del microbio de interés para la detección de ribosomas y proteínas ribosomales.

La señal que proporciona la detección de ribosomas intactos se puede amplificar mediante la detección de las proteínas ribosomales obtenidas por disociación de ribosomas intactos, por ejemplo cada ribosoma de *E. coli* contiene 55 proteínas distintas, 34 en la subunidad 50S y 21 proteínas en la subunidad 30S. Por ejemplo, las células aisladas de una muestra, tal como se describe en el presente documento pueden ser lisadas y los ribosomas que contienen se pueden disociar en moléculas de proteína individuales en un único paso por la adición de un agente caotrópico (por ejemplo, tiocianato de guanidina). Aproximadamente un tercio de la masa del ribosoma es proteína y unos dos tercios de la masa del ribosoma es ARN ribosomal (ARNr). Por tanto, la detección de las 55 proteínas ribosomales que componen cada uno de los 200 000 ribosomas de una única célula bacteriana puede proporcionar una amplificación hipotética de la señal de aproximadamente un millón más que la amplificación de la única célula cultivable. Por otra parte, las 55 distintas moléculas de proteína de cada ribosoma tendrán múltiples epítomos (secuencias de aminoácidos de longitud limitada y composición variable, cuyo número depende de la masa de proteína) que se pueden unir a anticuerpos específicos. Por el contrario, se ven menos epítomos de proteína en la superficie del ribosoma intacto; la mayoría de los epítomos se entierran internamente o se unen específicamente al ARNr y no tendrán acceso a sus anticuerpos específicos. Por tanto, se pueden utilizar los anticuerpos monoclonales y policlonales específicos para proteínas ribosomales del microbio de interés para el aislamiento, la detección y cuantificación de ribosomas o proteínas ribosomales de ribosomas disociados.

Algunos ejemplos utilizan antisueros policlonales de conejo y cobaya producidos contra ribosomas purificados, por ejemplo, de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, y *Staphylococcus epidermidis*. O bien, se pueden utilizar anticuerpos para proteínas ribosomales de otros microorganismos.

Por ejemplo, tal y como se ilustra en la Figura 5, un método puede comprender el paso de recuperar y concentrar un microorganismo 102 (por ejemplo, una bacteria) de una muestra 104, utilizando un sustrato 106 con un agente de unión o bacteriófago 108 específico para el microorganismo. El agente 108 es inmovilizado sobre un soporte sólido 106 (por ejemplo, poliestireno, sílice u otro soporte como obleas, varillas, filtros o microesferas) o se encuentra libre y es inmovilizado posteriormente sobre un soporte sólido. El microorganismo inmovilizado se puede retirar posteriormente de la muestra (por ejemplo, por aspiración, decantación o fuerza magnética). El microorganismo puede ser después lisado *in situ* sobre el soporte sólido y/o liberado en un pequeño volumen (por ejemplo, un pocillo de microtitulación) 112 para el posterior análisis. Por ejemplo, las células del microorganismo concentradas son lisadas mediante la adición de un pequeño volumen de una mezcla de productos químicos y enzimas para liberar ribosomas 114 directamente sobre el soporte sólido y/o en un volumen menor 112 como una placa de microtitulación.

En un ejemplo adicional y/o alternativo, las proteínas ribosomales pueden ser

detectadas utilizando anticuerpos anti-ribosomas 116 (por ejemplo, Figura 5). Como se sabe en la técnica, los anticuerpos anti-ribosoma primarios pueden ser marcados directamente (por ejemplo, con una biomolécula fluorescente) 118, o la unión de los anticuerpos primarios a los ribosomas se puede detectar con anticuerpos secundarios.

En otros ejemplos de los métodos y sistemas, y tal y como se ilustra en la Figura 6, las células del microorganismo 102 en una muestra 104 pueden ser lisadas

in situ (por ejemplo, en la muestra) mediante la adición de una mezcla de productos químicos y enzimas para liberar los ribosomas 114. Los ribosomas pueden ser posteriormente recuperados de la muestra y concentrados utilizando un sustrato 106 con un agente de unión inmovilizado 122 que se une específicamente a los ribosomas (por ejemplo, un anticuerpo u otro agente de unión). Los ribosomas concentrados se pueden disociar posteriormente en subunidades 126 con un agente caotrópico, el agente puede ser diluido o retirado, y las proteínas individuales 126 pueden ser identificadas, por ejemplo, utilizando un anticuerpo 117 marcado con una fracción detectable 119. Por ejemplo, las subunidades de proteína ribosomal se pueden recuperar y concentrar por un método como, entre otros, el uso de un concentrador de centrifugación o que elimine el agente de disociación, y las subunidades de proteína se identifican como se describe aquí.

Los ribosomas y/o proteínas ribosomales pueden ser identificados por un inmunoensayo estándar o mediante métodos de amplificación por inmunoensayo basados en microesferas-anticuerpos, como los descritos en el presente, o con otros métodos bioquímicos, inmuoquímicos, de inmunofluorescencia o biofísicos sensibles conocidos en la técnica. Por tanto, se pueden utilizar ensayos ELISA, RIA o de inmunofluorescencia para detectar y cuantificar las proteínas ribosomales.

O bien, sin retirar el agente de disociación, las subunidades de proteína ribosomal se pueden depositar en un sustrato de unión adecuado en un método de Microarray de proteínas de fase inversa (RPPMA). El sustrato puede ser bloqueado para evitar la unión de otras macromoléculas, y las subunidades de proteínas se pueden identificar por la unión a moléculas indicadoras. Por ejemplo, en un método de microarray de fase inversa, las proteínas desnaturalizadas se pueden alinear directamente sobre un portaobjetos de vidrio recubierto de nitrocelulosa, someterse a una sonda con anticuerpos primarios, y cultivarse con un complejo de anticuerpo secundario-indicador, como un complejo de anticuerpo secundario biotinilado-QDot (ver por ejemplo, Geho et al., 2007, Fluorescence-based analysis of cellular protein lysate arrays using quantum dots, 229-237, en "Quantum Dots, Applications in Biology", Methods in Molecular Biology: 374, Bruchez and Hotz, eds., Humana Press).

En otro ejemplo adicional y/o alternativo, y tal y como se debate detalladamente en este documento, los ribosomas intactos o las moléculas de proteínas ribosomales se pueden detectar (directamente o con aumento de 50-100X) agrupando las microesferas grandes (por ejemplo, microesferas de 15 µm) recubiertas con anticuerpos anti-ribosoma por concentraciones óptimas de ribosomas o proteínas ribosomales en la zona de equivalencia. Las secuencias de ARNr sobre la superficie del ribosoma intacto pueden presentar un campo de alta carga negativa que puede repeler a los anticuerpos. En un ejemplo, estas cargas se pueden neutralizar con pequeñas moléculas básicas como BAC (bencildimetilalquilamoniocloruro). En este ejemplo, los ribosomas, en lugar de localizarse en un soporte sólido, pueden estar dispersados en un pocillo de microtitulación.

Inmunodetección amplificada de proteínas de bacteriófago y/o proteínas ribosomales

En ciertos aspectos, la presente divulgación utiliza la alta especificidad de biomoléculas que se han unido a un soporte sólido para amplificar más una señal como medio para detectar bajos niveles de los analitos (por ejemplo, una proteína de interés) presentes en una muestra. En ciertos ejemplos, para los ensayos inmuoquímicos (por ejemplo, ELISA o RIA) o de inmunofluorescencia en los que una proteína que se pretende identificar está unida directamente o a través de anticuerpos de captura en una superficie pasivada, se puede conseguir una amplificación de la señal de unas 10 000 veces.

Por tanto, se divulga un método para detectar un analito de interés que comprende la adición al analito de interés de un soporte de detección, donde el soporte de detección comprende un soporte sólido que comprende una pluralidad de moléculas de un agente de unión que reconoce el analito de interés y se une a este; y la detección de al menos parte de la pluralidad de moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección. El método puede comprender además la adición de un soporte de captura, donde el soporte de captura comprende al menos un agente de unión al soporte de captura que reconoce el analito de interés y se une a este, a fin de inmovilizar el analito de interés sobre el soporte de captura. El analito de interés se une al soporte de captura antes de interactuar con el soporte de detección. O bien, el analito de interés se puede unir al soporte de captura después de interactuar con el soporte de detección. El método puede comprender asimismo la adición de un agente de unión que puede reconocer específicamente al menos parte de la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas

sobre el soporte de detección. El agente de unión que puede reconocer específicamente al menos parte de la pluralidad de moléculas de unión y unirse a estas en el soporte de detección es un agente de unión soluble.

El soporte sólido de captura puede ser un pocillo de ensayo (por ejemplo, una placa de microtitulación). O bien, el soporte sólido de captura puede ser una ubicación en un array, o un soporte móvil, como una microesfera. El soporte de detección es un soporte móvil como una microesfera. En ciertos ejemplos, el analito de interés se puede encontrar en solución. O bien, el analito de interés puede ser una proteína dentro de un microorganismo y/o tejido, de forma que tras la fijación, las macromoléculas de la célula funcionan como soporte de captura. Por ejemplo, se pueden utilizar métodos de amplificación por inmunoensayo para la detección *in situ* de proteínas.

El soporte de detección que comprende una pluralidad de moléculas de un agente de unión que reconoce específicamente el analito de interés se añade en exceso a una muestra que comprende el analito de interés. También en un ejemplo, el soporte de detección comprende una pluralidad de moléculas de una fracción detectable. Alternativamente, cuando se usa un agente de unión para reconocer la pluralidad de moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección, por ejemplo un anticuerpo secundario, el agente de unión soluble puede comprender una fracción detectable.

Se pueden utilizar diversos agentes de unión. Por ejemplo, la pluralidad de moléculas del agente de unión unidas al soporte de detección pueden ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que reconoce el analito de interés.

Adicional y/o alternativamente, el agente de unión unido al soporte de captura puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que reconoce el analito de interés. Adicional y/o alternativamente, el agente de unión que puede reconocer específicamente al menos parte de la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas sobre el soporte de detección (por ejemplo, un anticuerpo secundario) puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. O bien, el agente de unión sobre el soporte de captura o el soporte de detección, o el agente de unión

que puede reconocer específicamente al menos parte de la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas sobre el soporte de detección que puede comprender una proteína que se une a una diana distinta de una proteína (por ejemplo, una proteína que se une específicamente al analito de interés de una molécula pequeña o un receptor que se une a una proteína).

- 5 El agente de unión que puede reconocer específicamente al menos parte de la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas sobre el soporte de detección (por ejemplo, anticuerpo secundario) no reconoce el agente de unión de captura utilizado para unir el analito de interés al soporte sólido de captura.

El uso de un soporte de detección que comprende una pluralidad de agentes de unión que reconocen el analito de interés permite la amplificación de la señal. En ejemplos alternativos, el soporte de detección comprende más de 1000, o más de 10 000, o más de 100 000, o más de 500 000, o más de 1 000 000 de moléculas del agente de unión específico para el analito de interés. Por tanto, en ejemplos alternativos, los métodos proporcionan una amplificación que oscila entre 1000 y 1 000 000 000, o entre 1000 y 100 000 000, o entre 5000 y 10 000 000, o entre 10 000 y 1 000 000, o entre 10 000 y 500 000, o entre 50 000 y 500 000 veces la señal observada en un inmunoensayo estándar no amplificado que no incluye un soporte de detección que comprende una pluralidad de agentes de unión de detección. O bien, se pueden conseguir rangos dentro de estos rangos.

El uso del soporte de detección y/o el soporte de captura puede comprender diversos formatos.

Por ejemplo, el analito de interés se puede unir primero al soporte de captura para después dejar que interactúe con el soporte de detección. Por tanto, el método puede comprender los pasos de unir una pluralidad de agentes de unión que se pueden unir específicamente a una proteína de interés en un soporte de captura. El método puede comprender también la adición del analito de interés en el soporte de captura. Después el método puede comprender la adición de un soporte de detección que comprende una pluralidad de agentes de unión de detección específicos para el analito de interés que está unido al soporte de captura, de forma que la detección de la pluralidad de agentes de unión de detección proporciona la amplificación de la señal.

Asimismo, el método puede comprender la adición de un agente de unión que puede reconocer específicamente la pluralidad de agentes de unión de detección y unirse a estos. El agente de unión que puede reconocer específicamente la pluralidad de agentes de unión de detección y unirse a estos es un agente de unión soluble. El tercer agente de unión puede comprender una fracción detectable. Por tanto, la realización de los pasos del método genera un complejo compuesto por el soporte de captura:agente de unión de captura:analito de interés: agente de unión de detección: soporte de detección:agente de unión soluble:fracción detectable.

- 30 Por ejemplo, las proteínas ribosomales y/o proteínas del agente infeccioso (por ejemplo, proteínas del bacteriófago) del microorganismo se someten a ensayo utilizando un ensayo que comprende la amplificación basada en microesferas a través de un soporte de detección tal y como se describe en el presente documento.

Por tanto, la Figura 7A ilustra un sistema de inmunoensayo «sandwich» indirecto no amplificado en el que los ribosomas, las proteínas ribosomales o el fago de progenie (u otras proteínas de interés del microorganismo que se va a someter a ensayo) se inmovilizan sobre un soporte sólido y posteriormente se detectan por un anticuerpo. Por ejemplo, tal y como se ilustra en la Figura 7A, las moléculas de proteína 206 del fago de progenie o ribosomales producidas mediante lisis y disociación de las células bacterianas, incluyendo ribosomas, por tratamiento con un agente caotrópico (por ejemplo, tiocianato de guanidina), o por disociación de la progenie del fago, pueden ser inmovilizadas sobre una superficie sólida 214 recubierta con anticuerpos primarios orientados anti-ribosoma o anti-fago 208 (por ejemplo, de conejo). En un ejemplo, la superficie sólida puede estar recubierta con proteína A/G, y posteriormente someterse a pasivación (es decir, ser recubierta para reducir la unión no específica). Alternativamente, los anticuerpos se pueden unir covalentemente a la superficie sólida y la superficie pasivada. Tal y como se muestra en la Figura 7A, los anticuerpos inmovilizados 208 pueden reconocer específicamente el ribosoma, la proteína ribosomal o la proteína del fago de interés 206, mientras que otras proteínas o biomoléculas 202, 204 no se unen. El ribosoma, la proteína ribosomal o la proteína del fago de interés 206 se puede detectar entonces mediante la adición de un segundo anticuerpo primario 211 que también reconoce el ribosoma, la proteína ribosomal o la proteína del fago de interés. Por ejemplo, el anticuerpo inmovilizado 208 puede ser un anticuerpo de conejo anti-ribosoma, mientras que el segundo anticuerpo primario 211 puede ser un anticuerpo de cobaya anti-ribosoma. El segundo anticuerpo primario puede ser detectado entonces con un anticuerpo secundario (por ejemplo, anticuerpo anti-cobaya) 212. En un ejemplo, el anticuerpo secundario 212 está marcado con una fracción detectable 210. Por ejemplo, el anticuerpo secundario puede estar marcado con una fracción fluorescente (por ejemplo, QDOTS®) o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano).

La Figura 7B ilustra un inmunoensayo de amplificación basado en microesferas «sandwich» que puede ser utilizado para detectar ribosomas, proteínas ribosomales o proteínas del fago de progenie (u otras proteínas de interés). Los ribosomas, las proteínas ribosomales o las proteínas del fago de progenie u otras proteínas de interés se inmovilizan sobre un soporte sólido y después se detectan por un anticuerpo. Por ejemplo, las moléculas de la proteína de interés 206 producidas por lisis y disociación de células bacterianas pueden ser inmovilizadas sobre una superficie sólida 214 recubierta con anticuerpos primarios orientados anti-ribosoma o anti-fago 208 (por ejemplo, de conejo). La superficie sólida puede, en ciertas realizaciones, estar recubierta con proteína A/G, y posteriormente pasivada (es decir, recubierta para reducir la unión no específica). Alternativamente, los anticuerpos se pueden unir covalentemente a la superficie sólida y la superficie pasivada. De forma similar al ensayo no amplificado, los

anticuerpos inmovilizados 208 pueden reconocer específicamente el ribosoma, la proteína ribosomal o la proteína del fago de interés 206, mientras que otras proteínas o biomoléculas 202, 204 no se unen.

A continuación, se puede añadir una microesfera recubierta con cientos o miles o decenas de miles o cientos de miles de un segundo anticuerpo primario 211 que también reconoce el ribosoma, la proteína ribosomal o la proteína del fago de interés 206. Por ejemplo, el anticuerpo inmovilizado puede ser un anticuerpo de conejo anti-ribosoma, mientras que el segundo anticuerpo primario puede ser un anticuerpo de cobaya anti-ribosoma. De este modo, el analito de interés 206 une las microesferas que comprenden la pluralidad de amplificación de los segundos anticuerpos primarios 211 que reconocen el analito de interés 206 en el soporte sólido 214. Por último, se añade un anticuerpo secundario (por ejemplo, anticuerpo anti-cobaya) 212 que reconoce el segundo anticuerpo primario 211. En un ejemplo, el anticuerpo secundario 212 está marcado con una fracción detectable 210. Por ejemplo, el tercer anticuerpo puede estar marcado con una fracción fluorescente (por ejemplo, QDOTS®) o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano). Por tanto, una única molécula de proteína puede producir una amplificación muy grande de la señal.

De este modo, para la detección de un microorganismo en una muestra, donde la disociación de ribosomas o partículas del fago de progenie de sus subunidades de proteína constituyentes proporciona una amplificación adicional (dado que cada ribosoma de *Escherichia coli* contiene 55 proteínas, y una partícula de bacteriófago como T4 puede contener miles de moléculas de proteínas), el método de inmunoensayo de amplificación de alta ganancia puede incluir los pasos de aislar el microorganismo de otros componentes en una muestra y disociar los componentes macromoleculares del microorganismo, incluyendo los ribosomas que contiene (o disociar la progenie del bacteriófago de los componentes de proteína), en un solo paso utilizando un agente caotrópico (por ejemplo, 6M tiocianato de guanidina). El método puede incluir asimismo la eliminación o dilución del agente disociador. El método puede incluir también la unión de anticuerpos primarios policlonales biotinilados específicos de ribosoma (o específicos de bacteriófago) (por ejemplo, producidos en un conejo) y la captura de los complejos proteína-anticuerpo mediante microesferas magnéticas «de captura» recubiertas con estreptavidina. Después el método puede incluir la unión de microesferas «de detección» recubiertas con una pluralidad (por ejemplo, decenas de miles) de anticuerpos primarios específicos de ribosoma (o específicos de bacteriófago) producidos en otras especies (por ejemplo, cobaya). En este punto, el método puede incluir el paso de unir una pluralidad de anticuerpos secundarios (por ejemplo, cabra anti-cobaya) conjugados con una fracción detectable (indicadora), como peroxidasa de rábano, QDOTS®, o nanocadenas de negro de humo, y someter a ensayo por desarrollo de fluorescencia u otra señal.

El determinante de la amplificación de alta ganancia es la gran superficie de las microesferas de detección que puede acoger la unión de un gran número de anticuerpos que son específicos para el analito de interés (por ejemplo, anticuerpos específicos de ribosoma). La superficie ocupada por 10^6 subunidades de proteína ribosomal (el número aproximado de subunidades de proteína ribosomal obtenido por disociación de los ribosomas en una célula bacteriana) es pequeña y esta superficie debe satisfacer la accesibilidad a las microesferas. En un ejemplo, un alineamiento bidimensional confluyente de 10^6 microesferas de $1\ \mu\text{m}$ ocupará aproximadamente $1\ \text{mm}^2$. Para un soporte de captura móvil (por ejemplo, una microesfera), el número de soportes de detección de un tamaño particular que se puede unir puede estar limitado por efectos estéricos. La unión de microesferas recubiertas con 10^5 anticuerpos primarios de moléculas de proteína individuales y la posterior unión de anticuerpos secundarios marcados se pueden someter a ensayo mediante ELISA, RIA o inmunofluorescencia, proporcionando amplificación de alta ganancia.

En otro ejemplo más, las células de la muestra (o los ribosomas liberados de las células en la muestra por los métodos descritos en el presente documento) se pueden concentrar por centrifugación sobre la superficie de un filtro de centrifugación de un tamaño de poro apropiado (típicamente de $0,45\ \mu\text{m}$ para bacterias y $0,02\ \mu\text{m}$ para ribosomas). Las células concentradas se pueden lisar entonces en un pequeño volumen de tampón (por ejemplo, unos $20\ \mu\text{l}$) como se describe en el presente documento para liberar los ribosomas. Los ribosomas (por ejemplo, unos 20 000 de una única célula bacteriana) se pueden transferir de la superficie del filtro a un pocillo de una placa de microtitulación. En este punto, los ribosomas o las proteínas ribosomales pueden ser identificados por la formación de un entramado tras la adición de -3000 microesferas de poliestireno de gran tamaño (típicamente de 15 a $20\ \mu\text{m}$ de diámetro) que se unen a anticuerpos policlonales que pueden reconocer múltiples epítomos en los ribosomas o las proteínas ribosomales. Cada microesfera de gran tamaño se puede unir a -10^7 anticuerpos y si las microesferas han sido previamente recubiertas con proteína G u otra proteína que forma complejos con los anticuerpos, los anticuerpos se orientan para la unión óptima del antígeno. La formación de entramados (agrupación de microesferas) como resultado de que los ribosomas o las proteínas ribosomales establecen puentes con anticuerpos anti-ribosoma inmovilizados en microesferas separadas puede ser rápida y se puede observar directamente sin aumento, dependiendo del tamaño y del número de microesferas empleado, o bien visualizarse con un microscopio óptico con un aumento de 50-100x. El uso de diluciones en serie de las proteínas ribosomales identificará la zona de equivalencia en la que las concentraciones de moléculas de proteínas y anticuerpos unidos a microesferas son óptimas para la aglutinación de microesferas. Los complejos de microesfera-proteína G-anticuerpo agregados (agrupados) con un número conocido de ribosomas o proteínas ribosomales pueden servir como control positivo, y los complejos de microesfera-proteína G-anticuerpo no agregados en tampón sin ribosomas ni proteínas ribosomales pueden servir como control negativo.

La Figura 8 ilustra varios inmunoensayos alternativos que pueden ser utilizados para detectar analitos de interés de un microorganismo. En ciertos ejemplos, los ensayos proporcionan amplificación con microesferas.

Como se muestra en la Figura 8A, los métodos 1a y 1b ilustran ejemplos

de un inmunoensayo no amplificado y amplificado, respectivamente, para las proteínas ribosomales y/o del fago. En estos ensayos, se añaden moléculas de anticuerpo biotinilado primario libres 230 (por ejemplo, de conejo) específicas para un analito de interés 206 (por ejemplo, proteínas ribosomales o de fago) para que se unan a las moléculas diana en solución. Las moléculas del anticuerpo biotinilado 230 pueden reconocer específicamente el analito de interés 206, mientras que otras proteínas o biomoléculas 202, 204 no se unen. En este punto, se puede añadir una microesfera o microesferas magnéticas «de captura» recubiertas con estreptavidina 240 (por ejemplo, de aprox. un micrómetro de diámetro) para que se unan cuantitativamente a los complejos de anticuerpo biotinilado-proteína. El método puede incluir el bloqueo de los complejos de microesfera-proteína por adición de biotina y albúmina de suero bovino (BSA).

En este punto, en el ensayo amplificado (método 1b), se añade una microesfera o microesferas «de detección» 233 recubiertas con cientos, o miles, o decenas de miles, o cientos de miles o más moléculas de un segundo anticuerpo primario anti-ribosoma 211 producido en una especie diferente (por ejemplo, cobaya) para que se unan a epítomos abiertos no ocupados de las moléculas de proteína ribosomal. La cantidad de segundas moléculas de anticuerpo primario 211 se puede detectar utilizando moléculas de un anticuerpo secundario (por ejemplo, anticuerpo anti-cobaya) 212 que reconoce el segundo anticuerpo primario 211. En un ejemplo, las moléculas del anticuerpo secundario 212 están etiquetadas con una fracción detectable 210. Por ejemplo, el anticuerpo secundario puede estar marcado con una fracción fluorescente (por ejemplo, QDOTS®) o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano). Por tanto con una sola molécula de proteína se origina una amplificación de la señal muy grande, debido a la presencia de un gran número de segundas moléculas del anticuerpo primario sobre la microesfera de detección. En contraste y con fines comparativos, en el método 1a se ilustra un ensayo sandwich de inmunofluorescencia indirecta que utiliza microesferas de captura pero no la microesfera de detección de amplificación.

La Figura 8B (método 2) ilustra una forma alternativa del ensayo no amplificado del método 1a, pero donde las segundas moléculas del anticuerpo primario 211 y las primeras moléculas del anticuerpo primario 230 se añaden simultáneamente, y antes de la adición de la microesfera o microesferas recubiertas de estreptavidina 240.

La Figura 8C (método 3) ilustra una forma alternativa del ensayo amplificado del método 1b, pero donde las primeras moléculas del anticuerpo primario 230 y la microesfera o microesferas de detección 233 recubiertas con las segundas moléculas del anticuerpo primario anti-ribosoma 211 producidas en una especie diferente (por ejemplo, cobaya) se añaden antes de la adición de la microesfera o microesferas de captura recubiertas con estreptavidina 240 que reconocen las primeras moléculas del anticuerpo primario 230. Esto puede promover la formación de un complejo entre el analito de interés 206 y la microesfera o microesferas del soporte de detección 233 y las primeras moléculas del anticuerpo primario 230.

La Figura 8D (método 4) ilustra una forma alternativa del ensayo amplificado del método 1b, pero donde la microesfera o microesferas de detección 233 recubiertas con una pluralidad de segundas moléculas del anticuerpo primario anti-ribosoma 211 producidas en una especie diferente (por ejemplo, cobaya) comprenden una pluralidad de moléculas de una fracción detectable 210 como parte de la microesfera o microesferas de detección 233 (por ejemplo, por unión covalente o recubrimiento en la superficie) en lugar de estar unidas a las segundas moléculas del anticuerpo primario anti-ribosoma 211. La fracción detectable 210 puede comprender una fracción fluorescente (por ejemplo, QDOTS®) o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano). El método puede permitir el uso de menos agentes de unión de detección (por ejemplo, de los segundos anticuerpos primarios anti-ribosoma 211), si el soporte de detección comprende una pluralidad de fracciones detectables. Por ejemplo, el ratio de fracciones detectables 210:agentes de unión de detección 211 del soporte de detección 233 puede ser de 1:1, o 5:1, o 10:1, o 100:1, o 500:1, o 1000:1, 10 000:1 o superior. La fracción detectable puede comprender una fracción fluorescente (por ejemplo, QDOTS®) o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano).

La Figura 8E (método 5) ilustra una forma alternativa del ensayo del método 4, pero donde la microesfera o microesferas de detección 233 recubiertas con las segundas moléculas del anticuerpo primario anti-ribosoma 211 producidas en una especie diferente (por ejemplo, cobaya) y una fracción detectable 210 se añaden antes de la adición de la microesfera o microesferas de estreptavidina 240 que reconocen las primeras moléculas del anticuerpo primario 230. Esto puede promover la formación de un complejo entre el analito de interés 206 y la microesfera o microesferas del soporte de detección 233 y las primeras moléculas del anticuerpo primario 230.

La Figura 8F (método 6) ilustra una forma alternativa del método 3, pero donde la microesfera o microesferas de detección 233 recubiertas con las segundas moléculas del anticuerpo primario anti-ribosoma 211 producidas en una especie diferente (por ejemplo, cobaya) se añaden antes de la adición de las primeras moléculas del anticuerpo primario 230 y de la microesfera o microesferas de estreptavidina 240 que reconocen las primeras moléculas del anticuerpo primario 230. Esto puede promover la formación de un complejo entre el analito de interés 206 y la microesfera o microesferas del soporte de detección 233.

La Figura 9 muestra los resultados con el método 6, que ilustra la detección de ribosomas del equivalente a 500 o 2000 células de *E. coli*. El eje X indica el número de células bacterianas y el eje Y indica la señal respecto de un control que no contiene células bacterianas.

5 Puede ser importante que el anticuerpo secundario y/o el segundo anticuerpo primario de detección no se unan al anticuerpo del soporte de captura, dado que esta unión podría provocar señal de fondo. Por tanto, el paso de detección comprende la adición de un anticuerpo secundario que reconoce el agente del anticuerpo primario de detección sobre la microesfera de detección, pero donde el anticuerpo secundario no reconoce el agente de unión de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo primario) utilizado para unir la proteína de interés al soporte de captura.

10 Los soportes sólidos de captura y/o detección pueden ser tratados con un agente de pasivación. Por ejemplo, el analito de interés puede ser capturado en una superficie pasivada (es decir, una superficie que ha sido tratada para reducir la unión no específica). Uno de estos agentes de pasivación es BSA. Adicional y/o alternativamente, cuando el agente de unión utilizado es un anticuerpo, los soportes sólidos de captura y/o detección pueden estar recubiertos con proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L u otro agente que se una con alta afinidad al anticuerpo del agente de unión. Estas proteínas se unen al dominio Fc de los anticuerpos y, por tanto, pueden orientar la unión de los anticuerpos que reconocen la proteína o proteínas de interés. Los soportes de detección y/o captura pueden ser microesferas de poliestireno o microesferas fabricadas de un material similar u otro material, de forma que las microesferas puedan ser recubiertas con proteínas, pero no reaccionan con otros componentes del ensayo. En ciertos ejemplos, las microesferas son suficientemente grandes como para que una pluralidad de moléculas del anticuerpo se pueda unir a la microesfera. Por ejemplo, el tamaño de las microesferas puede oscilar entre unos 0,1 y 50, o 0,2 y 40, o 0,3 y 30, o 1 y 20, o 1 y 15 o unos 1 y 3 μm de diámetro. El tamaño de las microesferas puede depender del tamaño del ensayo que se pretende realizar. Para un ensayo realizado en un pocillo de microtitulación, se pueden utilizar microesferas de aproximadamente un micrómetro (μm).

25 El soporte de detección puede comprender una pluralidad de agentes de unión de detección. Por ejemplo, el número de agentes de unión en el soporte de detección puede ser mayor de 100, o mayor de 500, o mayor de 1000, o mayor de 5000, o mayor de 10 000, o mayor de 20 000, o mayor de 50 000, o mayor de 100 000, o mayor de 500 000, o mayor de 1 000 000 moléculas del agente de unión de detección. Por ejemplo, el soporte de detección puede comprender una microesfera que está recubierta con decenas o cientos de miles de moléculas de anticuerpos.

30 Puede haber entre unas 10 000 y 10 000 000 o entre unas 50 000 y 1 000 000, o entre unas 100 000 y 500 000 moléculas del agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo primario) para una microesfera del soporte de detección que tiene unos 15 μm de diámetro. Para microesferas del soporte de detección de diferentes tamaños, se puede utilizar la correspondiente cobertura de superficie.

35 Los métodos proporcionan una amplificación que oscila entre 1000 y 1 000 000 000, o entre 1000 y 100 000 000, o entre 5000 y 10 000 000, o entre 10 000 y 1 000 000, o entre 10 000 y 500 000, o entre 50 000 y 500 000 veces la señal observada en un inmunoensayo estándar no amplificado que no incluye un soporte de detección que comprende una pluralidad de agentes de unión de detección. O bien, se pueden conseguir rangos dentro de estos rangos.

40 En ciertos ejemplos, las microesferas del soporte de detección son suficientemente grandes como para que una pluralidad de moléculas del agente de unión se pueda unir a la microesfera. Por ejemplo, el tamaño de las microesferas puede oscilar entre unos 0,1 y 50, o 0,2 y 40, o 0,5 y 30, o 1 y 20, o 1 y 15 o unos 1 y 3 μm de diámetro. Cuando el agente de unión que se va a unir a la microesfera es un anticuerpo, se pueden utilizar microesferas disponibles en el mercado previamente recubiertas con proteína G, proteína A o proteínas A/G, dado que estas proteínas se unen al dominio Fc de los anticuerpos, orientando los anticuerpos de forma que los dominios Fab queden libres para unirse a los epítomos de los antígenos.

45 Como se ha descrito anteriormente, se puede añadir un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo secundario que reconoce el segundo anticuerpo primario en el soporte de detección) que ha formado un complejo con una enzima o material fluorescente (QDOTS® u otro marcador fluorescente) para que se una al gran número de anticuerpos utilizados como agentes de unión de detección en un soporte de detección. Se puede utilizar un ensayo inmunoquímico (por ejemplo, ELISA) o excitación y visualización del material fluorescente en un sistema apropiado de captura de imágenes de emisión para cuantificar la proteína. La clave para el elevado factor de amplificación de la señal que proporciona este método es la gran superficie del soporte de detección que puede acoger la unión de agentes de unión de detección. Por ejemplo, para los anticuerpos, se pueden utilizar aproximadamente más de 10 000 y más de 100 000 moléculas para recubrir microesferas de 1 μm y 2,8 μm , respectivamente.

Detección de ribosomas por un ensayo de flujo lateral (LFA)

55 Los ribosomas se pueden detectar utilizando un ensayo de flujo lateral (LFA) o un ensayo inmunocromatográfico. Estos ensayos se pueden realizar de forma rápida y sencilla, y pueden producir un resultado visual en una hora. El ensayo puede comprender un ensayo de flujo lateral ultrasensible que utiliza nanocadenas de negro de humo (CBNS), que sirven como soporte del anticuerpo y para la lectura del resultado (Lonnberg et al., *J. Immunol. Methods*, 339: 236-244 (2008)).

Por ejemplo, el ensayo de flujo lateral puede comprender un soporte sólido que permite el flujo de moléculas en una sola dirección. El soporte sólido puede comprender una tira que tiene una longitud superior a la anchura (Figura 10A). La tira puede consistir en una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa u otro tipo de sustrato absorbente) y una almohadilla absorbente en contacto con la membrana (Figura 10A). La membrana puede contener una línea de ensayo con anticuerpos anti-ribosoma de una primera especie (por ejemplo, conejo) que reconoce el analito de interés (por ejemplo, ribosomas, proteínas ribosomales, proteínas de fago) y una línea de control con anticuerpos secundarios que reconoce anticuerpos de la primera especie (por ejemplo, anticuerpos de cabra anti-conejo). En la Figura 10A también se muestran las nanocadenas de negro de humo 300 recubiertas con un anticuerpo anti-ribosoma 302.

El ensayo se puede realizar aplicando la muestra en la parte inferior de la membrana («región de aplicación de la muestra») (Figura 10B) y permitiendo que la muestra fluya por capilaridad a través de la superficie de la membrana, tal y como se muestra en la Figura 10A. El analito de interés presente en la muestra puede por tanto interactuar con los anticuerpos inmovilizados y unirse a estos en la línea de ensayo (por ejemplo, anticuerpos anti-ribosoma para analitos del ribosoma), mientras que el resto del material de la muestra continuará en la almohadilla absorbente. Las tiras se pueden incubar entonces con nanocadenas de negro de humo previamente recubiertas con anticuerpos (CBNS-Ab) que también reconocen el analito de interés (por ejemplo, anticuerpos de conejo anti-ribosoma). Las tiras del LFA tienen anticuerpos de IgG de suero total mientras que la IgG de las CBNS-Ab es purificada por afinidad con el antígeno de interés. Se permite que los complejos CBNS-Ab fluyan a través de la superficie de nitrocelulosa. De este modo, los complejos CBNS-Ab pueden interactuar con ribosomas unidos a la línea de ensayo. Esta interacción se puede visualizar como una línea de gris a negra (Figura 10B). Cualquier CBNS-Ab no unida puede continuar por la tira y unirse a la línea de control anti-conejo, que también produce una línea gris/negra (Figura 10B). Si la muestra no contiene proteínas ribosomales, no se formará ninguna línea en la posición de la línea de ensayo, pero sí se formará una línea en la posición de la línea de control.

Las Figuras 10C y 10D muestran la detección de ribosomas de *E. coli* utilizando este ensayo de flujo lateral con nanocadena de negro de humo recubierta con anticuerpos de conejo anti-ribosoma. Por tanto, la Figura 10C muestra la detección de 10 ng de ribosomas utilizando CBNS recubierta con anticuerpos de conejo anti-ribosoma y la presencia de ribosomas en la muestra se visualiza como una línea en la posición de la línea de ensayo. La línea en el control indica que la CBNS-Ab ha migrado por la tira.

La sensibilidad del sistema CBNS-LFA se puede aumentar reduciendo la superficie de la línea de ensayo para concentrar la CBNS en una superficie más pequeña, a fin de aumentar la intensidad de la línea. Un complejo CBNS:anticuerpo secundario que se unirá a la CBNS-Ab ya localizada en la línea de ensayo se puede utilizar para aumentar más la intensidad de la señal. Un tercer método puede incorporar una enzima, por ejemplo peroxidasa de rábano (HRP), al complejo anticuerpo primario-CBNS o a un complejo anticuerpo secundario-CBNS de forma que se pueda añadir un sustrato HRP directamente a la tira para aumentar la intensidad de la línea convirtiendo el sustrato en un producto coloreado. Adicional y/o alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos biotinilados en la CBNS conjuntamente con estreptavidina soluble-HRP (SA-HRP) o SA-HRP unida a la CBNS como medio para aumentar la señal. La Figura 10D muestra un experimento que utiliza CBNS-anticuerpos anti-ribosoma biotinilados y desarrollado por visualización de CBNS-anticuerpos anti-ribosoma biotinilados (panel superior), así como por adición de un complejo de CBNS-estreptavidina conjugado con peroxidasa de rábano (SA-HRP-CBNS), y a continuación se añade un sustrato de peroxidasa de rábano colorimétrico (panel inferior). Se puede observar que resulta posible la detección de hasta 5 ng de ribosomas utilizando este método.

Amplificación proporcionada por agentes infecciosos

Se proporciona un método rápido y sensible para detectar un microorganismo en una muestra, donde el método incluye lo siguiente: poner en contacto la muestra con un agente infeccioso libre o unido a un agente de unión que se une a un soporte sólido, donde el agente infeccioso es específico para el microbio y por tanto puede aislar el microbio de la muestra. Por ejemplo, el microbio de interés es una bacteria y el agente infeccioso es uno o más bacteriófagos. O bien, para otros tipos de microorganismos se pueden utilizar otros agentes infecciosos.

Como se ha descrito anteriormente, los bacteriófagos son virus que se unen a bacterias particulares e inyectan su material genético. A continuación el bacteriófago utiliza la maquinaria de las bacterias para replicarse un ciento o cientos de veces en un breve periodo de tiempo. Algunos bacteriófagos son líticos, lo que significa que rompen la bacteria hospedadora, y el fago replicado (progenie) se libera en el entorno para buscar e infectar otra bacteria.

Adicionalmente, la mayoría de bacteriófagos son específicos para bacterias particulares en el sentido de que esa replicación de un bacteriófago particular solo ocurre en bacterias específicas. Por tanto, la presencia del bacteriófago amplificado identifica la presencia de la bacteria para la que es específico. Por otra parte, dado que el bacteriófago puede infectar una bacteria y producir el fago de progenie en tan solo una hora o menos, el tiempo de detección se reduce de forma significativa en comparación con la detección de una célula cultivable.

El hecho de si el bacteriófago ha infectado la bacteria se puede determinar por un ensayo que puede identificar la presencia de progenie del bacteriófago, o el marcador del bacteriófago, o un marcador bacteriano que se detecta tras la infección con el fago parental o el fago de progenie. El ensayo no solo puede identificar el bacteriófago, el marcador del bacteriófago y/o el marcador bacteriano, sino también la cantidad o la concentración del bacteriófago, el marcador del bacteriófago o el marcador bacteriano.

Se divulga un ensayo basado en bacteriófagos ultrasensible para la detección y cuantificación rápida de patógenos bacterianos.

Se divulga también un método para detectar una bacteria que comprende los pasos de: aislar al menos una bacteria de otros componentes de la muestra e infectar al menos esa bacteria con bacteriófago. El método también puede comprender el paso de eliminar la mayoría del fago introducido no adsorbido. El método también puede incluir el paso de incubar la célula infectada para promover la replicación del fago y la lisis celular para liberar el fago de progenie y detectar el bacteriófago de progenie, o un componente del bacteriófago de progenie disociado, donde la detección del bacteriófago o de un componente del bacteriófago (es decir, un marcador del bacteriófago) indica que la bacteria se encuentra presente en la muestra. El método puede comprender también la eliminación del fago introducido restante antes de detectar el fago de progenie.

Otros ejemplos descritos en el presente utilizan el fago de progenie y/o bacterias marcadas con una fracción detectable para facilitar la detección de bacterias infectadas. Por ejemplo, el fago de progenie puede comprender un gen que codifica una biomolécula detectable como proteína luciferasa. En un ejemplo alternativo, el fago de progenie se puede cuantificar mediante la infección de bacterias indicadoras que comprenden una biomolécula marcadora como proteína luciferasa (por ejemplo, se pueden utilizar bacterias que comprenden un plásmido que codifica esta biomolécula marcadora).

El uso de bacterias indicadoras para someter a ensayo células de muestra mediante la detección del fago de progenie de células indicadoras lisadas se ilustra en la Figura 11. Por tanto, en este ensayo, el fago parental utilizado para infectar una muestra bacteriana de interés se separa del fago de progenie y, a continuación, el fago de progenie se utiliza para infectar la bacteria indicadora modificada para que exprese una biomolécula que proporciona una señal detectable tras la lisis de la bacteria. Por ejemplo, la bacteria puede ser modificada por transfección con un plásmido que codifica una proteína luciferasa.

Por ejemplo, en estos experimentos, se realiza un cultivo de células indicadoras 401 (por ejemplo, bacterias que expresan proteína luciferasa). Mientras tanto, al menos parte de la muestra que comprende la bacteria a cuantificar 400 se coloca en un filtro de centrifugación para eliminar los medios y se añade una multiplicidad apropiada de fago biotinilado 406 (por ejemplo, fago T4) (el exceso de fago 406 se puede eliminar por lavado de centrifugación) y se permite la incubación suficiente para infectar y posteriormente lisar la bacteria para liberar el fago de progenie. El lisado resultante 411 se puede recoger a continuación, por ejemplo por centrifugación, y el filtrado 410 que contiene el fago de progenie y el fago parental biotinilado transferido a un soporte 412 que comprende estreptavidina 414 (por ejemplo, columnas de estreptavidina) para separar el fago parental biotinilado restante del fago de progenie 416 que no está biotinilado. A continuación, las células indicadoras 401 que producen una fracción detectable 403 (es decir, la bacteria que expresa proteína luciferasa) se añaden al fago de progenie 416 y se deja que el fago de progenie infecte la bacteria. Las células indicadoras infectadas se pueden incubar durante un tiempo suficiente para que se genere más fago y se produzca la lisis. El nivel de fracción detectable 403 (por ejemplo, luciferasa) liberado por la bacteria indicadora infectada se puede cuantificar entonces utilizando un luminómetro 418 u otros métodos de detección apropiados (por ejemplo, un fluorímetro para una proteína fluorescente).

Los datos de experimentos de ejemplo que utilizan este ensayo se muestran en las Figuras 12A-E.

Las Figuras 12A-C muestran datos separados de la primera y la segunda mitad del método ilustrado en la Figura 11. Las Figuras 12D y 12E muestran los datos del ensayo completo.

La Figura 12A muestra que tan solo una o dos células de *E. coli* pueden proporcionar una concentración de unidad formadora de placa (PFU) mensurable (es decir, aproximadamente 300-460 PFU) del fago de progenie a través de un ensayo de placa. Los puntos cercanos a 0 PFU (hasta unas 60 PFU) del eje Y se deben probablemente a que no se ha depositado ninguna célula en el filtro por casualidad, dado que es probable que una media de una célula por muestra tenga realmente 0 células.

La Figura 12B muestra que el ensayo del fago demuestra una respuesta dependiente de dosis en las células de la muestra introducidas, aumentando la producción del fago de progenie cuantas más células hay en la muestra.

Las Figuras 12A y 12B registran las concentraciones de células determinadas por el ensayo estándar de unidad formadora de colonia (CFU) durante una noche, demostrando así una sensibilidad similar, a la velocidad inherentemente más rápida de un ensayo de placa que se puede visualizar en menos de 8 horas.

La Figura 12 C muestra la detección de fagos que es el equivalente a una sola célula (es decir, 100 fagos) o a 27 células (es decir, 2700 fagos), utilizando la segunda mitad del método con la lisis de las células indicadoras que se recoge en la Figura 11. Esto demuestra que, cuando se combina, el ensayo del fago completo debería ser capaz de detectar incluso 1 célula por muestra.

La Figura 12D muestra la detección de 1, 5 y 7 células de muestra (por ejemplo, *E. coli*) en comparación con un ensayo estándar de CFU (la línea de puntos denota la señal de fondo). La Figura 12E muestra la detección con éxito de 100 a 10 000 células bacterianas (determinada por microscopía) por muestra, utilizando el ensayo del fago completo (la línea denota la señal de fondo). Por tanto, demuestra la sensibilidad de 1 a 10 000 células sin dilución alguna de la muestra. Esto supone 1 o 2 órdenes de magnitud más de sensibilidad que un ensayo estándar de CFU

durante una noche, donde no se pueden contar más de 500-700 CFU de forma fiable en una placa Petri, además de ser un ensayo mucho más rápido, que se realiza aproximadamente en 3 horas.

Por otra parte, el ensayo puede comprender la detección de ribosomas liberados por bacterias indicadoras. En este formato, el ensayo puede entonces aprovechar la ventaja de la amplificación que proporciona el fago de progenie, así como la amplificación que proporciona el gran número de ribosomas presentes en una sola célula bacteriana.

La estrategia de utilizar fago indicador se muestra en la Figura 13. En este método, una proteína de la cápside del fago se fusiona transgénicamente con luciferasa de forma que las partículas de progenie separadas del fago de entrada parental biotinilado de la columna de estreptavidina contienen luciferasa (u otra fracción de detección) y se pueden cuantificar directamente.

Como se ilustra en la Figura 13, en este método al menos parte de la muestra 500 que comprende la bacteria a cuantificar 502 se coloca en un filtro de centrifugación para eliminar los medios y se añade una multiplicidad apropiada de fago biotinilado 504 (por ejemplo, fago T4) que tiene una proteína de la cápside fusionada con luciferasa (fago indicador) (el exceso de fago 504 se puede eliminar por lavado de centrifugación) y se permite la incubación suficiente del fago parental restante para infectar y lisar la bacteria 511 para liberar el fago de progenie. El lisado resultante 510 se puede recoger a continuación, por ejemplo por centrifugación, y el filtrado que contiene el fago de progenie y el fago parental transferido a un soporte 412 que comprende estreptavidina 414 (por ejemplo, columna de estreptavidina) para separar el fago parental biotinilado del fago de progenie 516 que no está biotinilado. El nivel de luciferasa presente y activo como proteína de fusión con proteína de la cápside Soc en el fago de progenie indicador 516 se puede cuantificar después utilizando un luminómetro 418. Por ejemplo, unos 100-200 fagos de progenie por célula, donde cada uno comprende unas 900 copias de proteína de la cápside luciferasa, produce unas 200 000 copias de luciferasa.

La estrategia de utilizar fago indicador que produce luciferasa soluble se muestra en la Figura 14. En este método, el fago (por ejemplo, fago T4) es modificado para expresar una luciferasa soluble durante la replicación en lugar de la fusión de proteína de la cápside-luciferasa. La expresión de luciferasa es provocada por un promotor de la cápside viral (por ejemplo, el promotor Soc del bacteriófago T4), que produce una elevada expresión. El fago parental estará libre de luciferasa, por lo que cualquier luciferasa detectada en el ensayo debe proceder de la replicación del fago de progenie liberado por las células bacterianas.

Por tanto, generalmente no es necesario separar el fago parental del fago de progenie.

En estos experimentos, al menos parte de la muestra 600 que comprende la bacteria 602 se puede cuantificar en un filtro de cuantificación para eliminar los medios y se añade una multiplicidad apropiada de fago T4 biotinilado que expresa luciferasa en lugar de proteína de la cápside Soc 604. El fago parental 604 y el fago de progenie 616 del filtrado de la bacteria infectada 611 se pueden recopilar entonces, por ejemplo por centrifugación, y se puede cuantificar el nivel de luciferasa utilizando un luminómetro 418.

Por tanto, la divulgación presente utiliza tanto la alta especificidad que ofrecen los agentes infecciosos como la amplificación que ofrece la replicación de agentes

infecciosos como medio para detectar bajos niveles de un microorganismo presente en una muestra. Se divulgan métodos y sistemas que utilizan la especificidad de los bacteriófagos para el aislamiento de bacterias de una muestra y/o la amplificación que proporciona el bacteriófago de progenie para la detección de una bacteria en una muestra. Por ejemplo, la identificación de los componentes de proteína (por ejemplo, el fago lítico T4 de *Escherichia coli* tiene unas 2500 subunidades de proteínas) de 200 fagos de progenie de cada célula infectada puede producir una gran amplificación en comparación con los métodos dependientes del aislamiento e identificación de una sola célula cultivable.

Por tanto, algunos ejemplos incluyen el uso de un ensayo basado en bacteriófagos ultrasensible para la detección y cuantificación rápida de patógenos bacterianos.

Por ejemplo, el método puede comprender los pasos de: concentrar las bacterias de una muestra sobre un filtro bacteriológico (por ejemplo, un tamaño de poro de 0,45 µm); infectar la bacteria con bacteriófago biotinilado; lavar el fago introducido no adsorbido a través del filtro; incubar la célula infectada para la replicación del bacteriófago y la lisis celular; y eliminar el fago biotinilado introducido restante del lisado mediante el uso de purificación por estreptavidina (por ejemplo, una columna de centrifugación u otro soporte sólido).

La eliminación eficiente del fago introducido no adsorbido puede ser integral para cuantificar la progenie del fago. La incapacidad de eliminar o inactivar selectivamente el bacteriófago introducido no adsorbido puede obviar la cuantificación de partículas de progenie, y esto ha sido un importante impedimento de los métodos de detección de bacterias basados en bacteriófagos. El bacteriófago de progenie de la muestra se puede cuantificar mediante colocación en una placa y realizando un recuento (ensayo PFU) o mediante el uso de bacteria indicadora y fago indicador o el inmunoensayo de amplificación de alta ganancia que se describe aquí.

La presencia del bacteriófago de progenie indica la presencia de una célula bacteriana específica para el bacteriófago de la muestra y la ausencia del bacteriófago de progenie indica la ausencia de una célula bacteriana específica para el bacteriófago de la muestra.

El método puede incluir la puesta en contacto de la muestra con agentes infecciosos que están unidos a un soporte sólido u otro agente de unión (por ejemplo, bacteriófagos biotinilados que están unidos a una microesfera magnética recubierta de estreptavidina), donde los bacteriófagos son específicos para la célula bacteriana; incubar la muestra en condiciones efectivas para que el bacteriófago inmovilizado sobre el soporte sólido infecte la célula bacteriana; aislar el complejo de célula infectada-bacteriófago-soporte sólido; incubar para la replicación del fago y la lisis celular, que produce la liberación del fago de progenie que no se une al soporte sólido y, por tanto, se puede distinguir del fago inmovilizado introducido para infectar la bacteria; eliminar el soporte sólido con el exceso del bacteriófago introducido unido y los complejos de bacteriófago-envoltura celular; pasar el lisado por una columna de centrifugación de estreptavidina para eliminar cualquier fago biotinilado introducido restante; y cuantificar el fago de progenie por los métodos descritos aquí. Una vez más, la presencia del bacteriófago de progenie indica la presencia de una célula bacteriana específica para el bacteriófago de la muestra y la ausencia del bacteriófago de progenie indica la ausencia de una célula bacteriana específica para el bacteriófago de la muestra.

Para la detección de una célula bacteriana dada, se pueden seleccionar los bacteriófagos que son capaces de infectar la célula bacteriana, replicarse dentro de la célula bacteriana y lisar la célula bacteriana. Para cualquier célula bacteriana dada, hay una amplia variedad de bacteriófagos disponibles, por ejemplo, en la ATCC (unos 500 fagos) o mediante aislamiento de fuentes naturales que contienen las células hospedadoras. El bacteriófago también debería presentar especificidad para la célula bacteriana. Un bacteriófago es específico para una célula bacteriana cuando infecta la célula bacteriana dada y no infecta las células bacterianas de otras especies o cepas. Para la detección de una célula bacteriana particular, se seleccionaría preferiblemente un bacteriófago que proporcione un tamaño de explosión óptimo o máximo.

Cuando se utiliza un bacteriófago para el aislamiento de la bacteria y/o la amplificación de la detección de la bacteria, el rango de células bacterianas que se puede detectar por la presente invención está limitado únicamente por la disponibilidad de un bacteriófago específico para la célula bacteriana y los expertos en la técnica reconocerán que es muy elevado. Por ejemplo, hay una lista de los tipos de fagos disponibles de ATCC publicada por la organización, el Catalogue of Bacteria & Bacteriophages, y se encuentra disponible en internet en atcc.org. Otras organizaciones de este tipo también publican datos equivalentes en sus catálogos, que se pueden utilizar para identificar posibles reactivos de bacteriófagos para los métodos de la presente divulgación.

El tiempo de reacción total para la infección del fago de una bacteria, la multiplicación del fago o la amplificación en la bacteria, a través del lisado de la bacteria, se puede prolongar desde unas decenas de minutos hasta horas, dependiendo del fago y de la bacteria en cuestión, y de las condiciones ambientales. Una vez que la bacteria se ha lisado, el fago de progenie se libera en el entorno junto con todos los contenidos de la bacteria. El fago de progenie puede infectar otras bacterias presentes y repetir el ciclo para crear más fagos y más restos bacterianos. De esta manera, el número de fagos aumentará exponencialmente hasta que prácticamente no haya más bacterias que infectar.

Los bacteriófagos tienen la capacidad de presentar especificidad además de la capacidad de producir una cantidad sustancial de progenie en un breve periodo de tiempo. Y la replicación del bacteriófago denota una célula hospedadora viva. En condiciones óptimas de infección y medio de cultivo de la hospedadora, una combinación dada de fago/bacteria da lugar a un número constante de progenie del fago. Por lo general, el ciclo de infección lítica produce 100 o más partículas de fago de progenie a partir de una sola célula infectada en un plazo de entre media hora y una hora. En un ensayo puede ser necesario incluir estándares de comparación de control, realizados en el mismo medio, con cifras conocidas de fagos que infectan cifras conocidas de células diana unidas al sustrato.

Otros ensayos de detección

La presencia de bacteriófagos de progenie y/o ribosomas aislados de un

microorganismo también se puede determinar por otros métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el bacteriófago de progenie se puede detectar por métodos de ensayo en placas convencionales o mediante tecnologías automatizadas, incluyendo, por ejemplo, clasificadores de células, como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

El bacteriófago de progenie también se puede detectar por visualización directa (Anderson et al., (USA 2004/0137430). Esta visualización directa puede utilizar microscopía óptica o de fluorescencia. Entre los colorantes o enzimas que se pueden utilizar se incluyen entre otros, la sonda fluorescente Alexa Fluor (comercializada por Life Technologies/Molecular Probes, Grand Island, NY), Cy3, isotiocianato de fluoresceína, tetrametilrodamina, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, oxidasa de glucosa o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Alternativamente, se puede utilizar un sistema láser para detectar el bacteriófago marcado. Otros métodos de detección incluyen la detección de adenilato quinasa, ver Murphy et al., pp. 320-322 de *Bioluminescence and Chemiluminescence in Medicine and Disease, Clinical Chemistry and Microbiology*, y la detección utilizando un ensayo de detección de nucleación de hielo bacteriano basado en binomios, ver Irwin et al., *Journal of AO AC International* 83:1087-95 (2000). O el bacteriófago de progenie también se puede detectar por métodos que utilizan la bioluminiscencia, detectan la expresión de un gen de luciferasa clonado en el genoma del bacteriófago como se expone en las Figuras 12 y 13 o incorporado a una bacteria indicadora como se muestra en la Figura 11. Ver, por ejemplo, Loessner et al., *Applied and Environmental Microbiology* 62(4): 1133-1140 (1996).

También se pueden utilizar nanocristales QUANTUM DOTS (también referidos aquí como QDOTS®), fabricados por Life Technologies/Molecular Probes, en los métodos para detectar inmunocomplejos, por ejemplo para la detección de proteínas ribosomales o proteínas de fago liberadas de células bacterianas. QDOTS® son nanocristales que presentan una serie de características favorables en comparación con los colorantes fluorescentes convencionales.

5 A diferencia de los colorantes fluorescentes, los nanocristales QDOTS® fotoblanquean mucho más lentamente y muestran una fluorescencia mucho más brillante. Dado el conjunto de diferentes tamaños disponibles, los nanocristales QDOTS® cubren un espectro óptico más amplio (es decir, los diferentes tamaños emiten diferentes colores), permitiendo así la detección de diferentes organismos en la misma muestra. Los nanocristales QDOTS® se fabrican con la misma química de conjugación uniforme, por lo que ofrecen un comportamiento uniforme en múltiples entornos de ensayo. En la actualidad, los cristales QDOTS® están disponibles en forma de diversos conjugados diferentes, incluyendo estreptavidina, proteína A y biotina. En algunos ejemplos, los conjugados de estreptavidina se pueden utilizar para la fluorescencia de ribosomas o de bacteriófago de progenie o de sus proteínas constituyentes a través de un complejo QDOTS®-estreptavidina-biotina-anticuerpo, o bien los QDOTS® se pueden conjugar directamente con anticuerpos.

10 Los conjugados de estreptavidina son extremadamente brillantes, ofrecen una fotoestabilidad excelente y tienen una sola fuente de excitación.

Muestras

Cada uno de los métodos y sistemas pueden permitir la detección y cuantificación rápidas de microbios en una muestra. Por ejemplo, ciertos métodos se pueden realizar, más preferiblemente, en unas dos horas o menos.

20 Los microbios detectados por los métodos y sistemas incluyen patógenos de interés comercial, médico o veterinario. Estos patógenos incluyen bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, micoplasma y virus (proteínas de virus solo, ya que los virus no tienen ribosomas). Cualquier microbio para el que se haya identificado un agente de unión específico para el microbio en particular puede ser detectado por los métodos. Los expertos en la técnica apreciarán que no existen límites para la

25 aplicación de los presentes métodos, salvo por la disponibilidad de los pares de microbio/agente de unión específico necesarios.

30 Las células bacterianas detectables a través de la presente invención incluyen, entre otras, células bacterianas que son patógenos presentes en los alimentos o el agua. Las células bacterianas detectables por la presente invención incluyen, entre otras, todas las especies de *Salmonella*, todas las especies de *Escherichia coli*, incluyendo, entre otras *E. coli* 0157:H7, todas las especies de *Listeria*, incluyendo, entre otras, *L. monocytogenes*, y todas las especies de *Campylobacter*. Las células bacterianas detectables por la presente invención incluyen, entre otras, células bacterianas que son patógenos de importancia médica o veterinaria. Estos patógenos incluyen, entre otros, *Bacillus spp.*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus spp.*

35 La muestra puede ser una muestra medioambiental, de alimentos o de agua, así como muestras médicas o veterinarias. Las muestras pueden ser líquidas, sólidas o semisólidas. Las muestras pueden ser frotis de superficies sólidas. Las muestras pueden incluir materiales medioambientales, como muestras de agua, o los filtros de muestras de aire o muestras de aerosoles de colectores ciclónicos. Las muestras pueden ser de carne, aves, alimentos procesados, leche, queso u otros productos lácteos. Las muestras médicas o veterinarias incluyen, entre otros, sangre, esputo, líquido cefalorraquídeo, muestras fecales y diferentes tipos de frotis.

40 Las muestras se pueden utilizar directamente en los métodos de detección de la presente invención, sin preparación o dilución. Por ejemplo, las muestras líquidas incluyendo, entre otras, leche y zumos, se pueden someter a ensayo directamente. Las muestras se pueden diluir o suspender en solución, incluyendo, entre otras, una solución con tampón o un medio de cultivo bacteriano. Una muestra que es sólida o semisólida se puede suspender en un líquido, moliendo, mezclando o macerando el sólido en el líquido. Una muestra se debería mantener dentro de un intervalo de pH que favorezca la unión del bacteriófago a la célula bacteriana hospedadora. Una muestra debería contener asimismo las concentraciones apropiadas de cationes divalentes y monovalentes, incluyendo, entre otros Na⁺, Mg²⁺, y K⁺. Preferiblemente una muestra se debe mantener a una temperatura que conserve la viabilidad de cualesquiera células patógenas que contenga la muestra.

45 Preferiblemente durante todos los ensayos de detección, la muestra se debe mantener a una temperatura que mantenga la viabilidad de cualesquiera células patógenas presentes en la muestra. Durante los pasos en los que los bacteriófagos se unen a células bacterianas, es preferible mantener la muestra a una temperatura que facilite la unión del bacteriófago. Durante los pasos en los que los bacteriófagos se replican dentro de una célula bacteriana infectada o proceden al lisado de una célula infectada, es preferible mantener la muestra a una temperatura que promueva la replicación del bacteriófago y la lisis de la hospedadora. Estas temperaturas son al menos de unos 25 grados centígrados (°C), más preferiblemente no superiores a unos 45 °C, más preferiblemente de unos 37 °C. También es preferible que las muestras se sometan al mezclado o agitado suave durante la unión del bacteriófago, la replicación y la lisis celular. En otras realizaciones, la unión del fago se puede inhibir tras la infección, de forma

que las subunidades de las proteínas del fago se acumulen sin unirse y puedan proporcionar una amplificación adicional del fago de progenie.

Los ensayos pueden incluir varias muestras de control apropiadas. Por ejemplo, se pueden someter a ensayo muestras de control que no contienen bacteriófagos o muestras que control que contienen bacteriófagos sin bacterias, como controles para los niveles de la señal de fondo.

Sustratos

Los sustratos que se utilizarán en los métodos incluyen, entre otros, microesferas magnéticas o de poliestireno sencillas (Spherotech, Libertyville, IL; Life Technologies/Invitrogen, Grand Island, NY; Polyscience, Niles, FL; Thermo Scientific Pierce, Waltham MA; EMD Millipore, Billerica, MA; New England Biolabs, Ipswich, MA), y microesferas de sílice magnéticas o sencillas (AmsBio, Lake Forest, CA), revestimientos de látex, un filtro de membrana, un filtro de fibra o un sustrato sólido poroso. Los métodos para el uso de microesferas magnéticas se pueden encontrar, por ejemplo, en el folleto del envase de Dynabeads Protein G Prod. No. 10003D, en Kala et al., Analytical Biochemistry 254:263-266 (1997) y en Dutton, Genetic Engineering News, Volumen 22 (13), julio de 2002.

Hay un amplio espectro de partículas en el mercado, particularmente microesferas magnéticas y de poliestireno, disponibles en diversos tamaños. Para ciertos ejemplos, un juego preferente de partículas tiene un diámetro de partícula medio aproximado de un micrómetro (es decir, una micra). En particular en ensayos de aglutinación, un juego preferente de partículas tiene un tamaño de partícula medio (es decir, la dimensión más grande de las partículas) no superior a 20 micrómetros (es decir, micras).

Para ciertos ejemplos, por ejemplo recuperación de microorganismos, ribosomas, bacteriófagos o sus componentes, la concentración de partículas (por ejemplo, microesferas) es preferiblemente al menos de 10^8 por milímetro. La concentración de partículas (por ejemplo, microesferas) es preferiblemente no superior a 10^9 por milímetro.

Para ciertos ejemplos, como agrupación de partículas por ribosomas, bacteriófagos o sus componentes, el número de partículas (por ejemplo, microesferas) es preferiblemente al menos 300 partículas y no superior a 3000 partículas (por ejemplo, microesferas) en 10 a 20 μ l. En ejemplos que implican la visualización de microorganismos o virus unidos a microesferas, este número de partículas (por ejemplo, microesferas) permite la evaluación por microscopía óptica en un alineamiento bidimensional sin superposición de imágenes.

Entre los ejemplos de microesferas magnéticas o sencillas disponibles en el mercado se incluyen las microesferas de poliestireno recubiertas de proteína G, proteína A, proteínas A/G, epoxi o estreptavidina, todas ellas comercializadas por Invitrogen, Grand Island, NY, o por Spherotech, Libertyville, 111. MagSi, microesferas de sílice magnéticas con estos mismos recubrimientos, son comercializadas por AmsBio, Lake Forest, CA.

Sistemas para la detección de microorganismos

Las realizaciones de la invención también comprenden usos de kits para realizar los métodos de la invención.

Por ejemplo, en una realización, la invención comprende el uso de un kit que contiene componentes para detectar un microorganismo de interés que incluye: un componente para aislar el microorganismo de otros componentes de la muestra; un componente para lisar el microorganismo para liberar los ribosomas presentes en el microorganismo; y un componente para detectar los ribosomas, o un componente de los ribosomas, donde la detección de los ribosomas o de un componente de los ribosomas indica que el microorganismo se encuentra presente en la muestra.

No se incluyen en el alcance de protección una variedad de microorganismos. En un ejemplo, el microorganismo comprende al menos una bacteria, o un hongo, o una levadura. El componente que aísla el microorganismo comprende un agente de unión que reconoce el microorganismo y se une al mismo. El agente de unión puede estar unido a un soporte sólido.

El agente de unión puede ser un anticuerpo. O, cuando el microorganismo es una bacteria, el agente de unión puede ser un bacteriófago específico para la bacteria.

En un ejemplo, el kit puede comprender un anticuerpo primario que reconoce los ribosomas y al menos un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario. O bien, el kit puede comprender un anticuerpo primario que reconoce los ribosomas y al menos un segundo anticuerpo primario que reconoce los ribosomas. El segundo anticuerpo primario está unido a un soporte sólido. En otros ejemplos más, el soporte sólido comprende una pluralidad de segundos anticuerpos primarios.

Los ribosomas se pueden detectar utilizando un ensayo de flujo lateral. El kit puede incluir un soporte sólido que comprende anticuerpos anti-ribosoma. En un ejemplo, el kit puede comprender al menos una nanocadena de negro de humo que contiene anticuerpos anti-ribosoma adicionales.

Se divulga un kit que incluye componentes para detectar un microorganismo de interés que comprende: un componente para aislar al menos un microorganismo de otros componentes de la muestra; un componente para infectar al menos ese microorganismo con una pluralidad de un agente infeccioso parental; un componente para lisar al menos ese microorganismo infectado para liberar agentes infecciosos de progenie presentes en el microorganismo; y un componente para detectar los agentes infecciosos de progenie, o un componente de los agentes infecciosos de progenie, donde la detección del agente infeccioso o de un componente del agente

infeccioso indica que el microorganismo se encuentra presente en la muestra. En un ejemplo, el microorganismo es una bacteria y el agente infeccioso es un bacteriófago. Los kits pueden comprender diversos componentes para la detección de los agentes infecciosos de progenie. Por ejemplo, el agente infeccioso de progenie (como un bacteriófago) puede comprender una fracción indicadora. En una realización, la fracción indicadora del agente infeccioso de progenie puede comprender luciferasa fusionada con una proteína estructural (por ejemplo, proteína de la cápside del fago). En una realización, la fracción indicadora del agente infeccioso de progenie (por ejemplo, bacteriófago) puede ser una fracción detectable que se expresa durante la replicación, como una proteína luciferasa soluble. El kit puede comprender un microorganismo indicador (como una bacteria) que comprende una proteína que es liberada tras la lisis del microorganismo indicador cuando se infecta con agentes infecciosos de progenie. La liberación de la proteína del microorganismo indicador puede comprender una fracción detectable. Por ejemplo, la proteína liberada es una proteína luciferasa. El kit puede comprender componentes para que el agente infeccioso de progenie de las células de muestras infectadas y/o de las células indicadoras se pueda detectar por un ensayo de flujo lateral con nanocadenas de negro de humo. O bien, la proteína liberada por el microorganismo indicador puede comprender ribosomas. De este modo, el kit combina la amplificación que proporciona la infección del bacteriófago con la amplificación que proporciona la detección del ribosoma.

Kits para el aislamiento de microorganismos de una muestra

Los kits pueden contener reactivos para el aislamiento de bacterias de una muestra.

Por ejemplo, el kit puede comprender un anticuerpo específico para el microorganismo de interés. El anticuerpo puede comprender un primer agente de unión que puede ser reconocido por un segundo agente de unión, de forma que ese microorganismo pueda ser aislado mediante la interacción de los agentes de unión. Por ejemplo, el kit puede comprender anticuerpos biotinilados que reconocen un microorganismo de interés y microesferas recubiertas de estreptavidina.

El kit puede comprender un fago específico que se puede unir a un agente de unión inmovilizado como, entre otros: estreptavidina; biotina, un anticuerpo que se une específicamente al bacteriófago o a una estructura del bacteriófago, como la cabeza. El agente unido al bacteriófago se usa para unir el fago a un soporte sólido. Por ejemplo, el kit puede comprender un fago biotinilado específico para una bacteria de interés. De este modo, el fago biotinilado se puede unir a una microesfera magnética con estreptavidina. En ejemplos alternativos, se pueden unir bacteriófagos, fagos, micobacteriofagos (por ejemplo, para TB y para-TB), micofagos (por ejemplo, para hongos), fagos de micoplasma y cualesquiera otros virus que puedan invadir bacterias vivas, hongos, micoplasma, protozoos, levaduras y otros organismos microscópicos vivos a un soporte sólido para el aislamiento de un microbio de interés. Por ejemplo, entre los fagos ampliamente estudiados de *E. coli* se incluyen T1, T2, T3, T4, T5, T7, y lambda; otros fagos de *E. coli* disponibles en la colección ATCC incluyen phiX174, S13, 0x6, MS2, phiV1, fd, PR772, y ZIK1.

Kits para la detección de microorganismos basada en ribosomas

Los kits pueden comprender reactivos para la detección de ribosomas y/o proteínas ribosomales de un microbio de interés. Por ejemplo, el kit puede comprender antiseros policlonales producidos en conejos, ratones, cobayas o similares, por ejemplo, contra ribosomas purificados de *E. coli* o *Salmonella spp* o una célula de mamífero.

Un kit de LFA para la detección de proteínas ribosomales puede incluir tiras de muestras que contienen los anticuerpos apropiados tanto en la línea de ensayo como en la de control. Estos kits también pueden incluir cadenas de negro de humo unidas a anticuerpos específicos para el análisis de interés.

El kit también puede incluir un tampón y/o reactivos necesarios para la dilución de la muestra u otros reactivos. Entre los reactivos adicionales se pueden incluir materiales que sirven como controles y reactivos para una mayor amplificación de la señal. Por ejemplo, el kit puede incluir un CBNS-Ab secundario (es decir un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario para el análisis de interés). El kit también puede incluir reactivos de detección enzimáticos como peroxidasa de rábano (HRP) y/o sustratos de HRP. Los kits también pueden incluir un recipiente del tamaño adecuado para realizar el ensayo.

Kits para la detección de microorganismos basada en fagos

Para las técnicas de detección basadas en fagos, se puede utilizar cualquiera de los fagos disponibles en el mercado para generar los reactivos de los kits. Por ejemplo hay una lista de los tipos de fagos disponibles en la ATCC publicada por la organización, el Catalogue of Bacteria & Bacteriophages, y se encuentra disponible en internet (atcc.org) o en otras organizaciones depositarias conocidas.

El bacteriófago puede ser inmovilizado sobre un sustrato a través de uno de los múltiples procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo específico para el bacteriófago para unir un bacteriófago a un sustrato. Se puede utilizar proteína A, proteína G o ligandos como avidina, estreptavidina y biotina para unir el anticuerpo al sustrato. También se pueden utilizar métodos de enlaces covalentes para unir un bacteriófago a un sustrato. Por lo general, no se deberían utilizar anticuerpos con especificidad para proteínas de cola del bacteriófago, puesto que la unión de este anticuerpo a las proteínas de cola puede interferir con la capacidad de las partículas del bacteriófago para unirse a una célula bacteriana hospedadora.

- Los kits pueden incluir bacterias que comprendan fracciones de detección. Estas bacterias, denominadas «bacterias indicadoras», pueden estar compuestas de cepas bacterianas también susceptibles al mismo bacteriófago que la bacteria de la muestra a detectar. Por ejemplo, la cepa B de *E. coli* de tipo silvestre (ATCC), puede ser modificada para que exprese luciferasa o alguna otra fracción de detección, a partir de un plásmido de ADN. Los plásmidos se pueden construir *de novo* o basados en construcciones disponibles en el mercado, como plásmidos de luciferasa, pGL.4.10 (luciferasa de luciérnaga) (Promega, Madison WI) y pGL.4.70 (luciferasa de renilla). Se puede incluir un promotor constitutivo o viral para impulsar la expresión de la fracción de detección (por ejemplo, luciferasa), junto con otras secuencias de ADN comunes conocidas en la técnica (gen de resistencia a antibióticos y origen de la replicación).
- Adicional y/o alternativamente, los kits pueden comprender «fago indicador». El fago indicador puede consistir en un bacteriófago con sus genomas modificados para incluir genes para la expresión de fracciones de detección comunes, como luciferasa, proteína fluorescente verde o peroxidasa de rábano. Estos genes pueden estar integrados en una proteína de alto número de copias en una fusión, como una fusión de Soc-luciferasa en T4, o como una proteína soluble, no incorporada a la estructura del fago, sino expresada tras la infección de la bacteria.
- Los kits también pueden comprender filtros para la concentración y/o para proporcionar un sustrato para las bacterias que van a ser infectadas por el fago, y posteriormente lavadas, como filtros de centrifugación de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA). El kit también puede incluir columnas de afinidad por la estreptavidina que se utilizarán para separar el fago parental biotinilado del fago de progenie (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Los kits también pueden contener sustratos para el uso con fracciones de detección, como D-luciferin o Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, WI) para luciferasa de luciérnaga o coelenteracina para luciferasa de renilla.
- Asimismo, un kit de LFA para la detección de proteínas de bacteriófago puede incluir tiras de muestras que contienen los anticuerpos apropiados tanto en la línea de ensayo como en la de control. Estos kits también pueden incluir cadenas de negro de humo unidas a anticuerpos específicos para el analito de interés.
- El kit también puede incluir un tampón y/o reactivos necesarios para la dilución de la muestra u otros reactivos. Entre los reactivos adicionales se pueden incluir materiales que sirven como controles y reactivos para una mayor amplificación de la señal. Por ejemplo, el kit puede incluir un CBNS-Ab secundario (es decir un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario para el analito de interés). El kit también puede incluir reactivos de detección enzimáticos como peroxidasa de rábano (HRP) y/o sustratos de HRP. Los kits de la invención también pueden incluir un recipiente del tamaño adecuado para realizar el ensayo.
- Kits de inmunoensayo**
- El kit puede comprender reactivos para un inmunoensayo basado en microesferas.
- Se divulga un kit para someter a ensayo un analito de interés que comprende un soporte de detección, donde el soporte de detección comprende un soporte sólido que contiene una pluralidad de moléculas del agente de unión que pueden reconocer el analito de interés y unirse al mismo. El kit puede comprender un soporte de captura, donde el soporte de captura comprende al menos un agente de unión al soporte de captura que reconoce el analito de interés y se une al mismo.
- El kit puede comprender asimismo un agente de unión que puede reconocer específicamente la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas en el soporte de detección. El agente de unión que puede reconocer específicamente la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas en el soporte de detección es un agente de unión soluble.
- El soporte de detección y/o el soporte de captura pueden comprender diversos formatos. El soporte sólido de captura puede ser un pocillo de ensayo (por ejemplo, una placa de microtitulación).
- O bien, el soporte sólido de captura puede ser una ubicación en un array, o un soporte móvil, como una microesfera. En un ejemplo, el soporte de detección es un soporte móvil como una microesfera.
- Se pueden utilizar diversos agentes de unión en los kits. Por ejemplo, la pluralidad de agentes de unión unidos al soporte de detección pueden ser anticuerpos o fragmentos de un anticuerpo que reconocen el analito de interés. Adicional y/o alternativamente, el agente de unión unido al soporte de captura puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que reconoce el analito de interés. Adicional y/o alternativamente, el agente de unión que puede reconocer específicamente la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas sobre el soporte de detección puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En un ejemplo, el agente de unión que puede reconocer específicamente la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas sobre el soporte de detección no reconoce el agente de unión de captura utilizado para unir el analito de interés al soporte sólido de captura. O bien, el agente de unión del soporte de captura o del soporte de detección, o el agente de unión que puede reconocer específicamente la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas en el soporte de detección puede comprender una proteína que se une a una diana que no es una proteína (como una proteína que se une específicamente al analito de interés de una molécula pequeña o un receptor que se une a una proteína).

El soporte de detección puede comprender una pluralidad de fracciones detectables. Adicional y/o alternativamente, el agente de unión que puede reconocer específicamente la pluralidad de moléculas del agente de unión y unirse a estas sobre el soporte de detección puede comprender una fracción detectable.

5 El uso de un soporte de detección que comprende una pluralidad de agentes de unión que reconocen el analito de interés permite la amplificación de la señal. El soporte de detección comprende más de 1000, o más de 10 000, o más de 100 000, o más de 500 000, o más de 1 000 000 moléculas del agente de unión específicas para el analito de interés. Por tanto, el kit proporciona una amplificación que oscila entre 1000 y 1 000 000 000, o entre 1000 y 100 000 000, o entre 5000 y 10 000 000, o entre 10 000 y 1 000 000, o entre 10 000 y 500 000, o entre 50 000 y 500 000 veces la señal observada en un inmunoensayo estándar no amplificado que no incluye un soporte de detección que comprende una pluralidad de agentes de unión de detección. O bien, se pueden conseguir rangos dentro de estos rangos.

15 Por tanto, el kit puede comprender reactivos para el inmunoensayo basado en microesferas. Así pues, el soporte de detección puede comprender una microesfera recubierta con un anticuerpo que reconoce una proteína de interés. La microesfera puede ser una microesfera de poliestireno recubierta con proteína G, proteína A o proteínas A/G, que se encuentran disponibles en el mercado (por ejemplo, Invitrogen, Carlsbad CA) en una amplia variedad de tamaños. Otras microesferas que pueden resultar útiles incluyen las microesferas magnéticas de sílice recubiertas con estas mismas proteínas (microesferas MagSi comercializadas por AmsBio, Lake Forest, CA).

20 Así pues, el kit puede comprender una microesfera recubierta con un anticuerpo que reconoce una proteína ribosomal. O bien, el kit puede comprender una microesfera recubierta con un anticuerpo que reconoce una proteína de fago. Las microesferas pueden ser de poliestireno, de sílice, de vidrio u otros materiales, simples o derivatizadas para su unión a grupos químicos específicos.

25 Los sustratos que se utilizarán en los kits incluyen, entre otros, microesferas de poliestireno (Spherotech, Libertyville, 111.), microesferas magnéticas (Invitrogen; AmsBio), revestimientos de látex, un filtro de membrana, un filtro de fibra, un sustrato sólido poroso o libre de fibra. Los métodos para el uso de microesferas magnéticas se pueden encontrar, por ejemplo, en el folleto del envase de Dynabeads Protein G Prod. No. 10003D, en Kala et al., *Analytical Biochemistry* 254:263-266 (1997) y en Dutton, *Genetic Engineering News*, Volumen 22, número 13, julio de 2002.

30 Hay un amplio espectro de partículas en el mercado, particularmente microesferas magnéticas y de poliestireno, disponibles en diversos tamaños. Para determinados ejemplos, un juego preferente de partículas tiene un tamaño de partícula medio (es decir, la dimensión más grande de las partículas) de unos 20 micrómetros (es decir, micras). Para determinados ejemplos, un juego preferente de partículas tiene un tamaño de partícula medio (es decir, la dimensión más grande de las partículas) de no menos de 10 micrómetros (es decir, micras). Ejemplos de microesferas disponibles en el mercado son las microesferas de poliestireno recubiertas de proteína G, proteína A y proteínas A/G, y las microesferas de poliestireno recubiertas de estreptavidina comercializadas por Invitrogen, Carlsbad, CA o por Spherotech, Libertyville, 111. Otros proveedores de microesferas de poliestireno y magnéticas incluyen Thermo Scientific Pierce, Millipore, Polyscience y New England Biolabs. AmsBio, Lake Forest, IL es un proveedor de microesferas magnéticas de sílice, que están disponibles con todos los revestimientos de proteínas anteriormente indicados. Life Technologies/Invitrogen también suministra microesferas magnéticas con superficie de epoxi, que se unen a los anticuerpos covalentemente.

40 El número de moléculas de anticuerpo de las microesferas puede variar. En ejemplos alternativos puede haber entre unos 10 000 y 10 000 000 o entre unos 50 000 y 1 000 000, o entre unos 100 000 y 500 000 anticuerpos en una microesfera de aproximadamente un nm de diámetro. Para microesferas de diferentes tamaños, se puede utilizar la correspondiente cobertura de la superficie.

45 En ciertos ejemplos, las microesferas son suficientemente grandes como para que una pluralidad de anticuerpos anti-ribosoma se pueda unir a la microesfera. Por ejemplo, el tamaño de las microesferas puede oscilar entre unos 0,1 y 50, o 0,2 y 40, o 0,5 y 30, o 1 y 20, o 1 y 15 o unos 1 y 3 μm de diámetro. Para formar un complejo del anticuerpo de interés con la microesfera, la microesfera puede ser previamente recubierta con proteína G, proteína A, proteínas A/G u otra proteína que forme un complejo con el anticuerpo de interés. Generalmente estas microesferas están disponibles en el mercado. Los kits para un inmunoensayo con microesferas también pueden comprender anticuerpos primarios adicionales para la proteína de interés, donde estos anticuerpos son de una segunda especie. Estos anticuerpos se utilizan en los ensayos tipo sandwich descritos en el presente documento, porque se unen a complejos de anticuerpo secundario-indicador, y los complejos secundarios no se unen a anticuerpos de la primera especie en la superficie sólida, lo que provocaría falsas reacciones positivas. Sin embargo, también se pueden utilizar anticuerpos de una segunda especie para recubrir una superficie sólida y/o un pocillo de microtitulación como se describe en el presente.

55 Los kits también pueden comprender anticuerpos secundarios que pueden ser utilizados para detectar los anticuerpos primarios, donde estos anticuerpos pueden ser anticuerpos anti-globulina de la segunda especie. Estos anticuerpos pueden ser marcados con un marcador detectable o un agente de unión que puede formar un complejo con un marcador detectable. Por ejemplo, un kit puede comprender un anticuerpo secundario que se une a un fluoróforo. El fluoróforo puede comprender un QDOT®. Por ejemplo, la estreptavidina-QDOTS® se puede unir a anticuerpos secundarios biotinilados que reconocen, por ejemplo, un anticuerpo primario anti-ribosoma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento de ribosomas purificados

Se obtuvo *E. coli* de ATCC (#11303) y se cultivó en LB Medium (Difco: 10g Tryptone, 5g de extracto de levadura, 10g NaCl/L) hasta el día siguiente a 37°C. Se colocó una colonia en 5mL de LB Medium y se incubó a 37°C hasta el día siguiente. Al día siguiente el cultivo se diluyó 1:100 en caldo LB nuevo y las células se cultivaron hasta una concentración de Klett 68 (OD a 600nm = 0,8) (20 unidades Klett en un Summerson Photoelectric Colorimeter = 0,1 OD a 540nm en un espectrofotómetro), que corresponde aproximadamente a 4×10^8 células/mL después del cultivo durante unas 3,5 horas. A continuación las células se peletizaron en un rotor Beckman Coulter XL 80K Type 19 (Cat. No. 325632) a 5000 rpm durante 15 minutos. Los gránulos se resuspendieron en 1 mL de TMS (50mM Tris-HCl, pH 7.8, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl) con 1/10 de volumen de 10X Bugbuster (Novagen, PN 70921-3), 0,5 mg/ml de lisozima (Sigma L6876), y 10ng/mL de DNasa I de alta calidad (libre de RNasa) (USB 14365). El lisado se clarificó en un tubo micrófugo de 1,5 mL en un rotor Beckman Coulter Allegra 64R F2402 a 16 000 rpm durante 10 min. El supernatante se transfirió a un tubo micrófugo limpio y se repitió el paso de clarificación. Los ribosomas se peletizaron en TMS mediante centrifugación a 35 000 rpm durante 3 horas a 4°C en un rotor Beckman Coulter SW40Ti y los gránulos se resuspendieron en 0,5 ml de TMS. La suspensión se clarificó y se cargó en gradientes de sacarosa al 10/30% (en peso) en TMS (BioComp GradientMaster, BioComp, New Brunswick, CA) y se centrifugó a 35 000 rpm durante tres horas a 4°C en un rotor Beckman Coulter SW40Ti. Las bandas resultantes de ribosomas se retiraron utilizando una aguja 21G x 1" en una jeringa de 3mL. Los ribosomas se peletizaron de nuevo como se ha descrito anteriormente y los gránulos se resuspendieron en PBS o TMS. Las proteínas ribosomales se caracterizaron mediante SDS- PAGE y la pureza de las partículas se confirmó por tinción negativa en microscopía electrónica.

Ejemplo 2: Producción de anticuerpo policlonal en conejos

Los ribosomas purificados, aislados como se describe en el Ejemplo 1, se combinaron con un adyuvante apropiado. Los ribosomas y el adyuvante se inyectaron bajo la piel de conejos jóvenes (2,5-3,0 kg; 10-16 semanas de edad). Se sacó sangre de la arteria central de la oreja con una aguja de calibre 19 y se dejó coagular y reposar a 37°C hasta el día siguiente. A continuación, la sangre coagulada se refrigeró durante 24 horas antes de decantar y clarificar el suero por centrifugación a 2500 rpm durante 20 minutos. Los conejos fueron inyectados y se les extrajo sangre siguiendo el siguiente programa:

- Día -4: Extracción de sangre previa
- 30 Día 0: Inmunización por vía intradérmica (ID) utilizando CFA (adyuvante completo de Freund)
- Día 7: Inyección de refuerzo por vía intradérmica (ID) utilizando IFA (adyuvante incompleto de Freund)
- Día 14: Inyección de refuerzo por vía subcutánea (SC) utilizando IFA
- Día 28: Inyección de refuerzo por vía subcutánea (SC) utilizando IFA
- Día 38: Extracción de sangre para el ensayo
- 35 Día 40: Envío de muestras de sangre pre-inmunización y muestras de sangre de ensayo a NGI
- Día 45: Extracción de sangre terminal (*aprobado*)
- Día 47: Envío de muestras de sangre de extracción terminal a NGI
- Día 49 Fin de proyecto (*aprobado*)

Ejemplo 3: Captura de bacterias de solución utilizando anticuerpos específicos de células y micropartículas magnéticas

Para demostrar la captura intacta, se generaron células bacterianas viables de una solución de anticuerpos policlonales de conejo para epítomos de superficie de diversas especies de bacterias (por ejemplo, *E.coli* y *S. typhimurium*).

Los cultivos de *E. coli* y *S. typhimurium* se cultivaron en medios líquidos antes de la recogida y se lavaron con tampón de fosfato (1,1 mM KH₂PO₄, 5,6 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH 7.4). Las células lavadas se diluyeron a una concentración de 5-20 células por ml. Se añadieron aproximadamente 250 ng de anticuerpos anti-*E.coli* policlonales biotinilados (equivalente aproximadamente a 1×10^{12} moléculas de anticuerpos) producido por Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA a la suspensión celular y se incubaron durante 45 min. También se realizó un experimento de control en el que no se añadió anticuerpo a la suspensión celular.

Tras la incubación del anticuerpo, se añadieron 4×10^8 micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Solulink, Inc., San Diego, CA) a la mezcla y se incubaron otros 15 minutos. A continuación se recogieron los complejos de célula-anticuerpo-microesfera utilizando un soporte magnético, la fracción no unida (supernatante) se eliminó y las microesferas se lavaron suavemente con un tampón de fosfato (1.1 mM KH₂PO₄, 5.6 mM Na₂HPO₄,

154 mM NaCl, pH 7.4). Las fracciones del supernatante («sup») y de las microesferas («microesf.») se distribuyeron después en placas de agar Luria-Bertani (LB) y se incubaron hasta el día siguiente a 37°C. Tras una noche de cultivo, las placas se inspeccionaron para determinar la formación de colonias. La Figura 2 ilustra un experimento de ejemplo; los recuentos de colonias se muestran debajo a izq/der. de cada placa.

5 Las Figuras 3A y 3B muestran la captura de proteína ribosomal utilizando IgG anti-ribosomal biotinilada y microesferas magnéticas unidas a estreptavidina. La Figura A demuestra que los anticuerpos anti-ribosoma y las microesferas de estreptavidina son necesarios y capaces de capturar ribosomas de una solución cuantitativamente. En el experimento mostrado en la Figura 3A, el lisado de 100 000 células en 0,6M de tiocinato guanidina/tampón fosfato salino con Tween-20 (1,1 mM KH₂PO₄, 5,6 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, 0,01% Tween-20, pH 7.4) se incubaron durante una hora con diversas cantidades de IgG anti-ribosoma biotinilada de conejo producida por Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA. También se incluyó un control sin lisado. Después, se añadieron entre 3,3 x 10⁷ y 1 x 10⁸ microesferas magnéticas Streptavidin (SA) magnetic Dynabeads (Life Technologies, Carlsbad CA) a cada reacción por lo que el ratio de anticuerpos:microesferas se mantuvo constante a 6000 moléculas de anticuerpo por partícula de microesfera. Se añadieron unas 5 x 10⁷ microesferas con SA al control «sin anticuerpo».

Las microesferas se recogieron utilizando un soporte magnético y, a continuación, se desnaturalizaron añadiendo un tampón de sulfato de dodecilo de sodio que contenía beta-mercaptoetanol y se llevaron a ebullición. A continuación se recogió el agente de elución utilizando un soporte magnético, se colocó en gel de poliacrilamida y se sometió a un análisis de transferencia western blot utilizando un anticuerpo anti-ribosoma de conejo y un anticuerpo secundario anti-conejo con peroxidasa de rábano (HRP). Se puede observar que cuando no se añade ningún anticuerpo anti-ribosoma, no se detectan proteínas ribosomales. También se puede observar que 50 ng de anticuerpos son capaces de unirse a todas las proteínas ribosomales de 100 000 células.

En la Figura 3A, la fila de Ponceau proporciona un control interno para demostrar que la muestra se cargó en todos los pocillos, dado que Ponceau es un colorante de proteína total utilizado para visualizar proteínas presentes en una membrana de una transferencia western blot. La fila de SA muestra la estreptavidina retirada de las SA Dynabeads durante el paso de desnaturalización/ebullición. Se puede observar que se utilizaron cantidades aproximadamente iguales de microesferas en cada paso de captura del ribosoma.

La figura 3B demuestra que la adición de biotina, anticuerpos anti-ribosoma biotinilados y microesferas de estreptavidina es suficiente para capturar todas las proteínas ribosomales presentes en solución. En este experimento, el lisado de 270 000 células en 0,6 M de tiocianato de guanidina/tampón fosfato salino con Tween-20 se incubó con o sin 200 ng de IgG anti-ribosoma biotinilada de conejo. A continuación, se añadieron 1 x 10⁸ microesferas magnéticas con SA para capturar los complejos de anticuerpo-proteína de ribosoma (8000 moléculas de anticuerpo por microesfera). El supernatante no unido se retiró de la fracción de las microesferas y se recapturó («recapt») utilizando 200 ng de biotina, anticuerpo y 1x10⁸ microesferas magnéticas con SA. Las microesferas recogidas se desnaturalizaron y se sometieron a un análisis de transferencia western blot utilizando un anticuerpo anti-ribosoma de conejo y un anticuerpo secundario anti-conejo con peroxidasa de rábano (HRP). La ausencia de proteínas ribosomales en el experimento de recaptura con lisado en el que las proteínas ribosomales se habían capturado previamente sugiere que el primer paso de captura fue suficiente para capturar todas las proteínas ribosomales.

40 Ejemplo 4: Captura de ribosomas utilizando diversos formatos de amplificación con microesferas

Se realizaron experimentos para comparar los diversos formatos de ensayo ilustrados en la Figura 8, en los paneles A-C y F (es decir, los métodos 1a, 1b, 2, 3 y 6). Básicamente, se prepararon lisados de *E. coli* (500 000 células) lisando células bacterianas en (10 000 células/μl) de 6M tiocianato de guanidina. A continuación, la concentración de tiocianato de guanidina se redujo a 0,12 o 0,6 M por dilución en tampón fosfato (por ejemplo, dilución de 90 000 células en 450 μl). A continuación se capturaron los ribosomas utilizando uno de los métodos de detección para la captura de ribosomas que se muestran en la Figura 8 (Tabla 1).

Método	Número de células de <i>E. coli</i>	Señal sobre el control de 0 células
Método 1a	10 000	6,05
	10.000	13,87
	20.000	15,22
	20.000	119,85
Método 1b	20.000	4,02
Método 2	10.000	2,33
	10.000	1,72

	20.000	1,85
	20.000	30,00
Método 3	2.000	6,17
	10.000	3,16
Método 6(1)*	4.000	9,3
Método 6(2)	500	1,8
	2.000	2,2
*Experimentos 1 y 2		

5 Se realizaron experimentos adicionales utilizando el método que se ilustra en el panel 8F. Este método utiliza la adición de microesfera-anticuerpo 2 (microesferas de carboxi y anticuerpos anti-ribosoma de conejo) al lisado. Esto permite que los ribosomas se unan a la microesfera, de forma similar a un ensayo ELISA sandwich convencional, donde los anticuerpos «de captura» son inmovilizados sobre una superficie. A continuación se añadió anticuerpo 1-biotina (cobaya) directamente a la mezcla sin ningún paso de lavado. Los complejos microesfera-anticuerpo 2-ribosoma-anticuerpo 1 se capturan utilizando microesferas con estreptavidina (SA) y se detectan utilizando anticuerpos secundarios para el anticuerpo 2. Se descubrió que este método funcionaba cuando se utilizaba anticuerpo de conejo-microesferas de carboxi (Ab2-microesfera) y biotina-anticuerpo de cobaya (Ab1).

10 Por tanto, en este experimento, el lisado de 2500, 5000, 10 000, o 20 000 células se incubó con unas $1,3 \times 10^8$ microesferas de carboxi ($0,1 \mu\text{m}$) con anticuerpo anti-ribosoma de conejo (Ab anti-ribo). A continuación se añadieron 10 ng (4×10^{10} moléculas de IgG) de anticuerpos anti-ribosoma biotinilados de cobaya y se incubaron. Los complejos microesfera-Ab-proteína ribosomal-Ab se capturaron con unas 4×10^7 CI SA Dynabeads. La detección se realizó con 10 ng de anticuerpo anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano (HRP). Una quinta parte de la muestra se cargó en una microplaca para detección con sustrato Sirius HRP en un luminómetro. Se puede observar que la señal se detectó incluso para tan solo 500 células.

Ejemplo 5: Ensayo de flujo lateral

20 Se desarrolló una tira de ensayo para LFA en colaboración con Medtox (A LabCorp company). La tira consiste en una membrana de nitrocelulosa y una almohadilla absorbente en contacto con la membrana de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa contiene una línea de ensayo con anticuerpos anti-ribosoma de conejo y una línea de control con anticuerpos anti-conejo de cabra. En la Figura 10A se muestra una vista esquemática de la tira.

25 El ensayo se realizó aplicando la muestra (0-10 ng de proteína ribosomal) a la parte inferior de la tira («región de aplicación de la muestra») y permitiendo que la muestra fluyera por capilaridad a través de la superficie de nitrocelulosa. Los ribosomas presentes en la muestra se unen a los anticuerpos anti-ribosoma inmovilizados en la línea de ensayo, mientras que el resto del material de la muestra continúa en la almohadilla absorbente. A continuación las tiras se incuban con una cadena de negro de humo (CBNS) previamente recubierta con anticuerpos anti-ribosoma de conejo (CBNS-Ab) y se deja que el complejo CBNS-Ab se desplace por capilaridad en la misma dirección que la muestra, atravesando la superficie de nitrocelulosa. Básicamente el recubrimiento de CBNS con anticuerpo se realiza incubando una solución de anticuerpos con una solución de CBNS que contiene 5-25 mM de NaCl. La unión de anticuerpo a CBNS es no específica. Tras una hora de incubación, los complejos de CBNS-Ab se lavaron y pasivaron con albúmina de suero bovino. Los complejos de CBNS-AB que interactuaron con los ribosomas unidos a la línea de ensayo produjeron una línea de color gris a negro, mientras que el CBNS-Ab no unido continuó subiendo por la tira y se unió a la línea de control anti-conejo, produciendo una línea gris/negra en esa posición de la tira. Si la muestra no contiene proteínas ribosomales no se formará una línea en la línea de ensayo, pero sí en la línea de control.

35 Un experimento de ejemplo se muestra en las Figuras 10C y 10D. El experimento mostrado en el panel C muestra el uso de una única CBNS con anticuerpo anti-ribosoma de conejo para la detección de ribosomas. En este experimento, los ribosomas de *E. coli* purificados (10 o 100 ng) se colocaron en tiras de LFA en tampón para LFA (25 mM de tricina, 5% maltitol, 2% sacarina sódica, 0,025% polivinilpirrolidona, 0,05% alcohol polivinílico, 0,5% Tetronic 1307, 0,5% Tetronic 904 y 0,005% azida de sodio, pH 8.0). Una vez que toda la muestra había entrado en la tira, las CBNS con anticuerpos anti-ribosoma de conejo se cargaron en las tiras. Las tiras se sometieron entonces a captura de imágenes y la intensidad de la línea se cuantificó utilizando el software ImageJ (NIH).

45 El experimento mostrado en el panel D utiliza dos complejos de CBNS diferentes. Uno tiene anticuerpo anti-ribosoma con biotina (CBNS-Ab) y el segundo complejo tiene estreptavidina-peroxidasa de rábano (CBNS-SA-HRP). En este experimento, los ribosomas de *E. coli* purificados (5 ng) se colocaron en tiras LFA en un tampón para LFA. Una vez que toda la muestra había entrado en la tira, las CBNS con anticuerpos anti-ribosoma de conejo biotinilados se cargaron en las tiras (CNBS-Ab (Figura 10D, cuatro tiras superiores). La mitad de las muestras, la CBNS

secundaria con SA-HRP, se cargó en las tiras. La fracción de SA de esta CBNS secundaria es capaz de unirse a la fracción de biotina del anticuerpo de conejo presente en la CBNS primaria. Esto resulta en una cantidad mayor de CBNS localizada en la línea de ensayo. Después, el sustrato de HRP (TMB) se añadió directamente a la superficie de nitrocelulosa y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir el desarrollo del producto TMB coloreado (Figura 10D, cuatro tiras inferiores; + TMB (sustrato HRP)). Las tiras se sometieron entonces a captura de imágenes y la intensidad de la línea se cuantificó utilizando el software ImageJ (NIH).

Ejemplo 6: Preparación de bacteriófago T4 biotinilado

Unas $2,4 \times 10^{10}$ unidades formadoras de placa (PFU) de fago T4 se diluyeron en 50 μ l tampón fosfato salino (PBS). Si el fago está en Tris que contiene tampón, como TMS, es necesario hacer un transfer de tampón, por ejemplo usando columnas Zeba Spin (Thermo Scientific Pierce, Waltham, MA).

Para preparar el reactivo de biotina, se añadieron 4 mg de Pierce NHS-reactivo de biotina a 1 ml de agua (4 μ g/ μ l). El reactivo se diluyó posteriormente hasta una concentración de 49,4 ng/ μ l (por ejemplo, adición de 2 μ l a 160,1 μ l de PBS). A continuación, se añadieron unos 500 ng de reactivo de biotina (10 μ l) a un tubo conteniendo unos $2,4 \times 10^{10}$ PFU de fago, y se incubó durante 2 horas a 4 grados centígrados ($^{\circ}$ C). A continuación, el fago biotinilado se desaló utilizando una columna Zeba. Para desalar el fago, la columna se lavó tres veces con 300 μ l de PBS a 1500g durante 1 minuto. A continuación, se añadió PBS al fago para elevar el volumen total hasta 100 μ l, y el fago (100 μ l) se añadió a la columna Zeba y se centrifugó durante 2 minutos a 1500g. Después el fago se sometió a titulación utilizando un ensayo de placa y se guardó a 4 $^{\circ}$ C.

Ejemplo 7: Captura de células basada en fagos y detección utilizando un fago indicador o una bacteria indicadora

a. Bacteria indicadora

El uso de una bacteria indicadora para someter a ensayo el fago de progenie se ilustra en la Figura 11. Por tanto, en este ensayo, el fago parental utilizado para infectar una muestra bacteriana de interés se separa del fago de progenie y, a continuación, el fago de progenie se utiliza para infectar la bacteria indicadora modificada para que exprese una biomolécula que proporciona una señal detectable tras la lisis de la bacteria. Por ejemplo, la bacteria se puede modificar para que exprese proteína luciferasa.

En estos experimentos, las células indicadoras se produjeron usando *E. coli* de tipo silvestre originalmente obtenida de ATCC, y transformada con plásmidos de luciferasa. Los plásmidos de luciferasa se basaron en pGL.4.10 (luciferasa de luciérnaga) y pGL.470 (luciferasa de renilla) (Promega, Madison, WI). Las modificaciones de los plásmidos para el uso en bacterias indicadoras incluyeron la inserción de un promotor bacteriano constitutivo (σ^{70}) secuencia arriba del gen de luciferasa. Este cultivo (por ejemplo, bacterias que expresan proteína luciferasa) se inoculó a 37 $^{\circ}$ C con agitación a 220 rpm en caldo LB con ampicilina (100 μ g/ml). Mientras tanto, unos 500 μ l de bacterias de muestra (es decir, las bacterias a cuantificar) se cargaron en un filtro de centrifugación MilliporeUltrafree MC-HV en un tubo de recogida de 2 ml de fondo redondo, se centrifugaron a más de 300g durante un minuto (hasta 8000 rpm de centrifugación) para eliminar los medios y se añadieron 40 μ l de fago T4 biotinilado (es decir, aprox. $2,7 \times 10^6$ PFU) en caldo LB. A continuación, las bacterias infectadas se lavaron aplicando unos 500 μ l de caldo LB y centrifugando a más de 300g durante 1 minuto, utilizando tubos de recogida de 2 ml, 4 veces. El que contenía las bacterias infectadas se transfirió del tubo de recogida de 2 ml a un tubo limpio de 1,5 ml, y tras añadir aproximadamente 200 μ l de caldo LB, las bacterias infectadas se incubaron durante una hora a 37 $^{\circ}$ C. A continuación las bacterias infectadas fueron recogidas por centrifugación (8000 rpm durante 2 minutos) y el filtrado que contenía el fago de progenie y cualquier fago parental biotinilado restante se transfirió a columnas de estreptavidina (por ejemplo, GE Healthcare Streptavidin HP SpinTrapcolumns). A continuación se incubaron las columnas durante 20 minutos a temperatura ambiente con rotación completa. En este punto, el eluato de la columna que contenía el fago de progenie se transfirió a un tubo limpio y el fago de progenie se recogió por centrifugación a 150g durante 1 minuto. El fago de progenie se detectó en este lisado mediante ensayo de placa convencional (ensayo PFU) o se sometió a detección con células indicadoras como las que se describen a continuación.

Después, las células indicadoras (es decir, bacterias que expresan luciferasa) se diluyeron hasta aproximadamente 10^6 células por ml de caldo LB y se añadieron 10 μ l de células indicadoras al tubo del fago de progenie. Se dejó que el fago infectase las bacterias por centrifugación de adsorción (por ejemplo, 8000 rpm durante 30 minutos). Las células indicadoras infectadas se resuspendieron y se incubaron con agitación a 220 rpm a 37 $^{\circ}$ C durante 1 hora. En este punto, las células indicadoras infectadas se aislaron utilizando filtración/centrifugación (8000 rpm durante 2 minutos) y se transfirieron 10 μ l del supernatante a un pocillo de una placa de 96 pocillos. A continuación, se cuantificó el nivel de luciferasa utilizando un luminómetro y el ensayo Promega Luciferase con 50 μ l de Luciferase Assay Substrate.

Los datos de los experimentos utilizando este ensayo se muestran en las Figuras 12A-E. Las Figuras 12A y 12B demuestran una señal mensurable y comparable respecto de la señal de fondo utilizando el ensayo del fago en comparación con un ensayo estándar de CFU nocturno. La Figura 12 A muestra que tan solo una o dos células de *E. coli* proporcionan una PFU mensurable (es decir, aproximadamente 300-460 PFU) del fago de progenie a través de un ensayo de placa. La Figura 12B compara la sensibilidad de un ensayo estándar de unidad formadora de colonias (CFU) con el ensayo del fago de la invención. Se puede observar que el ensayo del fago, aunque se realiza mucho

más rápido, ofrece aproximadamente la misma sensibilidad que un ensayo de CFU, y demuestra una respuesta dependiente de la dosis, con aumento del fago de progenie cuando se incrementan las células de la muestra. A pesar de que esto comprende solo la primera parte del ensayo del fago completo, utilizando ensayos de placa se pueden obtener resultados en el mismo día en comparación con un ensayo estándar de CFU nocturno.

- 5 La Figura 12C muestra la detección de fagos que es equivalente a la progenie de una sola célula (es decir, 100 fagos) o 27 células (es decir, 2700 fagos) utilizando células indicadoras (por ejemplo, la segunda mitad del ensayo del fago completo), lo que sugiere una alta sensibilidad.

La Figura 12D muestra la detección de 1, 5 y 7 células de muestra (por ejemplo, *E. coli*) en comparación con un ensayo estándar de CFU (la línea de puntos denota la señal de fondo).

- 10 La Figura 12E muestra la detección con éxito de 100 a 10 000 células bacterianas (determinada por microscopía) por muestra, utilizando el ensayo del fago completo (la línea denota la señal de fondo). Por tanto, demuestra la sensibilidad de 1 a 10 000 células sin dilución alguna de la muestra.

Esto supone 1 o 2 órdenes de magnitud más de sensibilidad que un ensayo estándar de CFU durante una noche, donde no se pueden contar más de 500-700 CFU de forma fiable en una placa Petri, además de ser un ensayo mucho más rápido, que se realiza aproximadamente en 3 horas.

- 15 La Figura 12D muestra el equivalente de 5 y 500 células de muestra (es decir, *E. coli*) y la Figura 12E muestra la detección de 1, 5 y 10 células bacterianas por ml utilizando el fago de progenie de la Figura 11. La Figura 12D muestra la detección de 1, 5 y 7 células de muestra (es decir, *E. coli*) en comparación con un ensayo estándar de CFU (la línea roja denota la señal de fondo).

- 20 La Figura 12E muestra la detección con éxito de 100 a 10 000 células bacterianas (determinada por microscopía) por muestra, utilizando el ensayo del fago completo (la línea denota la señal de fondo). Por tanto, demuestra la sensibilidad de 1 a 10 000 células sin dilución alguna de la muestra. Esto supone 1 o 2 órdenes de magnitud más de sensibilidad que un ensayo estándar de CFU nocturno, donde generalmente no se pueden contar más de 500-700 CFU de forma fiable en una placa Petri, además de ser un ensayo mucho más rápido, que se realiza aproximadamente en 3 horas.

25 b. Fago indicador

La estrategia de utilizar fago indicador se muestra en la Figura 13. En este método, la proteína de la cápside del fago se fusiona con luciferasa de forma que el fago de progenie que no está biotinilado se pueda separar del fago parental que está biotinilado, y cuantificarse directamente.

- 30 Para realizar el ensayo, unos 500 µl de bacterias de muestra (es decir, las bacterias a cuantificar) se cargarán en un filtro de centrifugación MilliporeUltrafree MC-HV en un tubo de recogida de 2 ml de fondo redondo, se centrifugarán a más de 300g durante 1 minuto (hasta 8000 rpm de centrifugación) para eliminar los medios y se añadirán 40 µl de fago T4 biotinilado (es decir, aprox. $2,7 \times 10^6$ PFU) en caldo LB. A continuación, se lavarán las bacterias infectadas aplicando unos 500 µl de caldo LB y centrifugando a más de 300g durante 1 minuto usando un tubo de recogida de 2 ml cuatro veces; la columna de filtrado que contiene las bacterias infectadas se podrá transferir entonces a un tubo limpio y tras la adición de unos 200 µl de caldo LB, las bacterias infectadas se incubarán durante 1 hora a 37°C. Después se recogerán las bacterias infectadas por centrifugación (8000 rpm durante 2 minutos) y el filtrado que contiene el fago de progenie y el fago parental biotinilado se podrá transferir a columnas de estreptavidina (por ejemplo, GE Healthcare Streptavidin HP SpinTrap columns). Después se incubarán las columnas durante 20 minutos a temperatura ambiente con rotación completa. En este punto, el eluato de la columna que contiene el fago de progenie se transferirá a un tubo limpio y el fago de progenie se recogerá por centrifugación a 150g durante 1 minuto. A continuación, se transferirán 10 µl del fluido a un pocillo de una placa de 96 pocillos y se cuantificará el nivel de luciferasa utilizando un luminómetro y el ensayo Promega Luciferase con 50 µl de Luciferase Assay Reagent.

45 c. Fago indicador con luciferasa soluble

La estrategia de utilizar fago indicador con luciferasa soluble se muestra en la Figura 14.

- En este método, el fago expresa luciferasa en lugar de la proteína de la cápside Soc. La expresión de luciferasa está impulsada por el promotor Soc, que produce una elevada expresión. En este caso no es necesario separar el fago parental del fago de progenie porque el fago parental estará libre de luciferasa (subproducto de la purificación del caldo del fago). Solo una infección productiva de bacterias en la muestra producirá luciferasa detectable.

- 50 Para realizar el ensayo, unos 500 µl de bacterias de muestra (es decir, las bacterias a cuantificar) se cargarán en un filtro de centrifugación MilliporeUltrafree MC-HV en un tubo de recogida de 2 ml de fondo redondo y se centrifugarán a más de 300g durante 1 minuto (hasta 8000 rpm de centrifugación) para eliminar los medios. El contenido del filtro de centrifugación se transferirá a un tubo limpio, se añadirán unos 40 µl de fago T4 biotinilado (es decir, aprox. $2,7 \times 10^6$ PFU) en caldo LB y se incubarán las bacterias infectadas durante 1 hora a 37°C. Las bacterias infectadas se recogerán entonces por centrifugación (8000 rpm durante 2 minutos), se transferirán 10 µl del fluido a un pocillo de una placa de 96 pocillos y se podrá cuantificar el nivel de luciferasa utilizando un luminómetro y el ensayo Promega Luciferase con 50 µl de Luciferase Assay Substrate.

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para detectar una bacteria de interés que comprende los pasos siguientes:
aislar la bacteria de otros componentes de la muestra; e
infectar al menos una bacteria con una pluralidad de un bacteriófago parental;
lisar al menos esa bacteria infectada para liberar el bacteriófago de progenie presente en la bacteria;
detectar el bacteriófago de progenie,
- 10 donde el bacteriófago parental está modificado para expresar una proteína soluble durante la replicación, y dicha expresión es impulsada por un promotor de la cápside viral, donde la detección de la proteína soluble indica que el bacteriófago de progenie se encuentra presente en la muestra, donde el método se realiza a una temperatura de al menos 37 grados centígrados y no superior a 45 grados centígrados.
2. El método de la reivindicación 1, donde el bacteriófago parental está unido a un soporte sólido.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 donde la proteína soluble o la proteína expresada comprende luciferasa.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, donde no existe separación del fago parental y el fago de progenie.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el paso de aislar la bacteria comprende la unión de la bacteria a un agente de unión; o donde el paso de aislar la bacteria comprende la unión de la bacteria a un agente
- 20 de unión que está unido a un soporte sólido.
6. El método de la reivindicación 5, donde el agente de unión es un anticuerpo específico para la bacteria.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el aislamiento comprende el filtrado en un filtro de centrifugación.
8. El uso de un kit en los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el kit incluye componentes
- 25 para detectar una bacteria de interés que comprende: un componente para aislar al menos una bacteria de interés de otros componentes de la muestra; un componente para infectar al menos esa bacteria de interés con una pluralidad de bacteriófagos parentales, donde los bacteriófagos parentales están modificados para que expresen una proteína soluble y dicha expresión es impulsada por un promotor de la cápside viral; un componente para lisar al menos esa bacteria infectada para que libere el bacteriófago de progenie presente en la bacteria; y un componente
- 30 para detectar la proteína soluble, donde la detección de la proteína soluble indica que la bacteria está presente en la muestra, donde el método se realiza a una temperatura de al menos 37 grados centígrados y no superior a 45 grados centígrados.
9. El uso del kit de la reivindicación 8, donde el bacteriófago está unido a un soporte sólido.
10. El uso del kit de conformidad con la reivindicación 8, donde la proteína soluble es luciferasa.

35

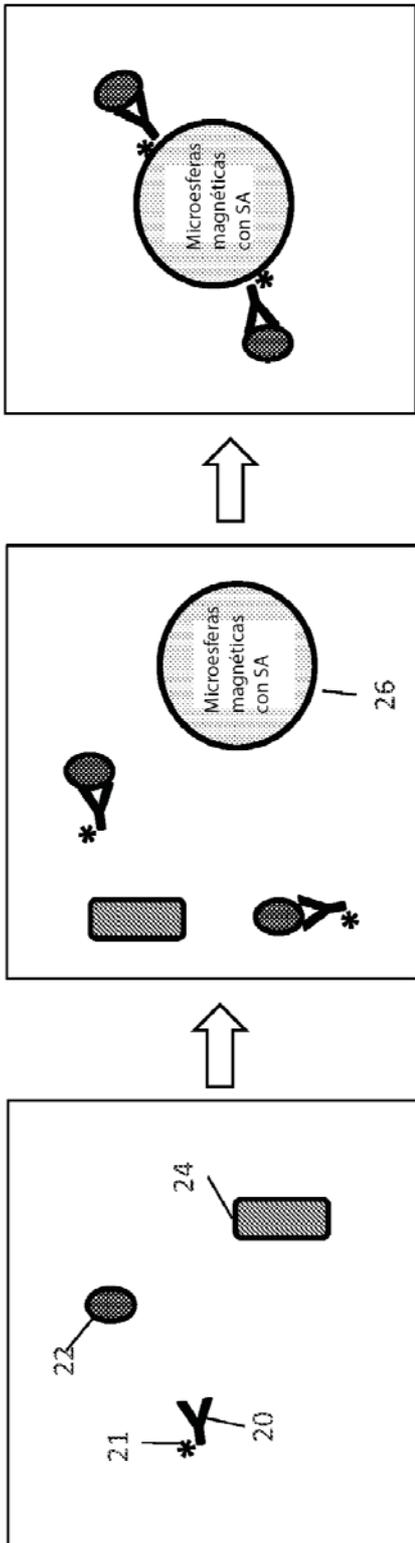


FIG. 1C

FIG. 1B

FIG. 1A

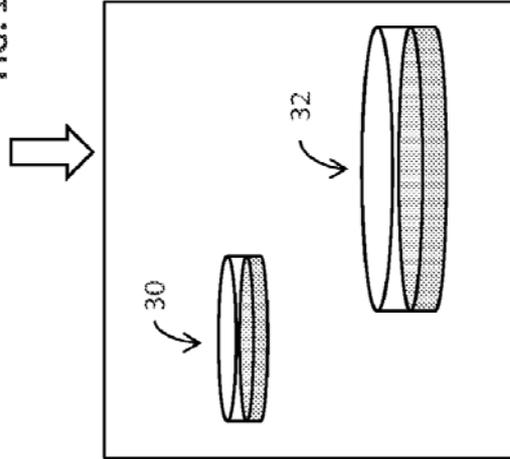


FIG. 1D

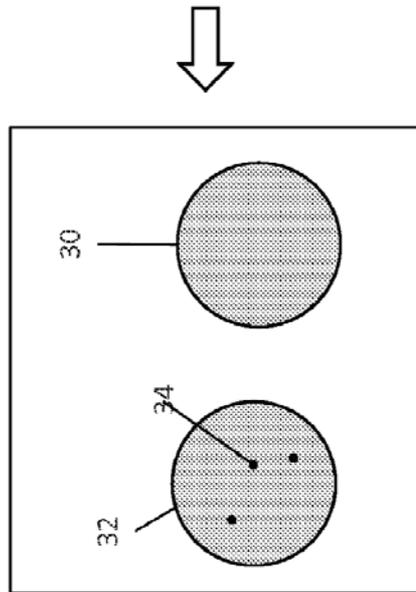


FIG. 1E

FIG. 2

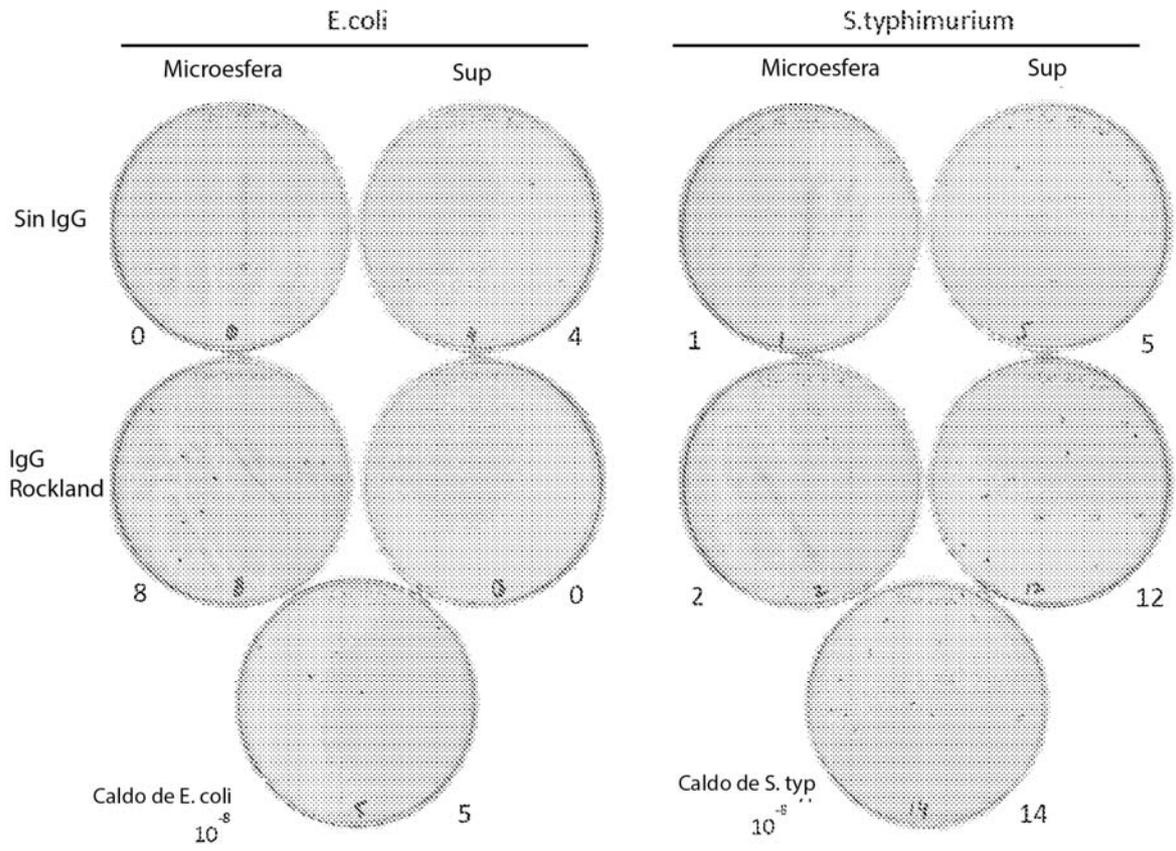


FIG. 3A

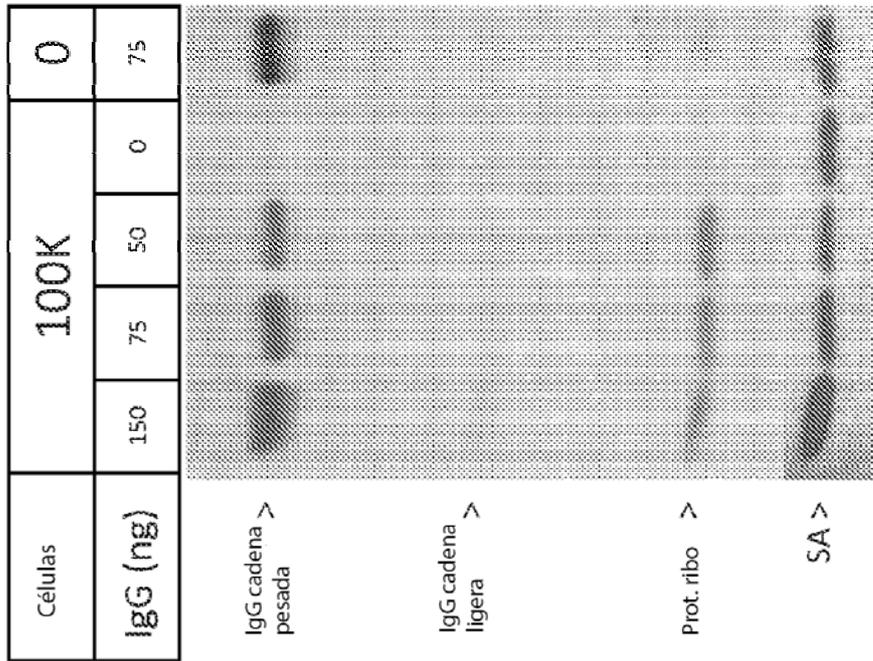


FIG. 3B

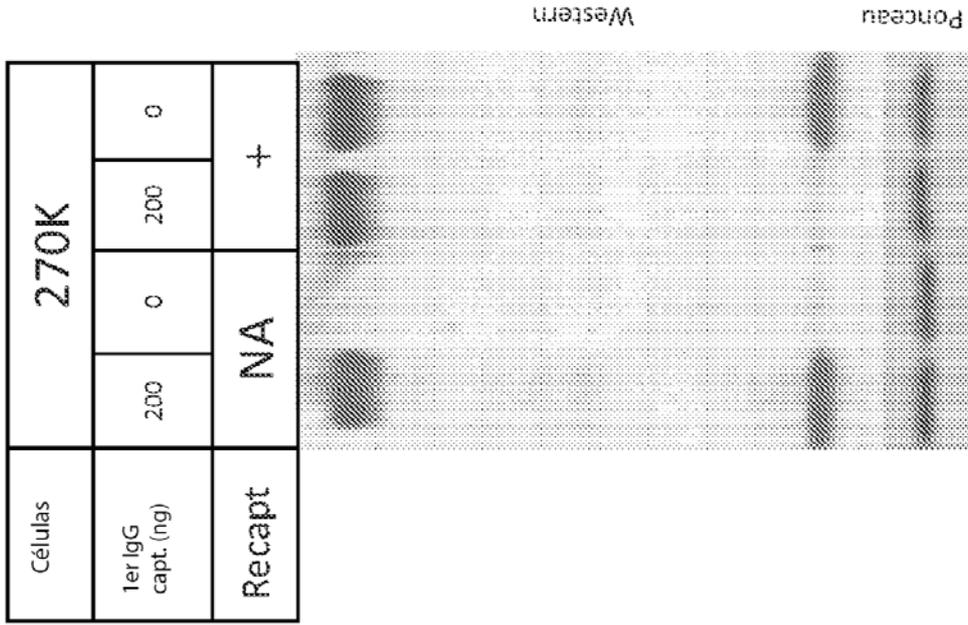


FIG. 4A (Técnica anterior)

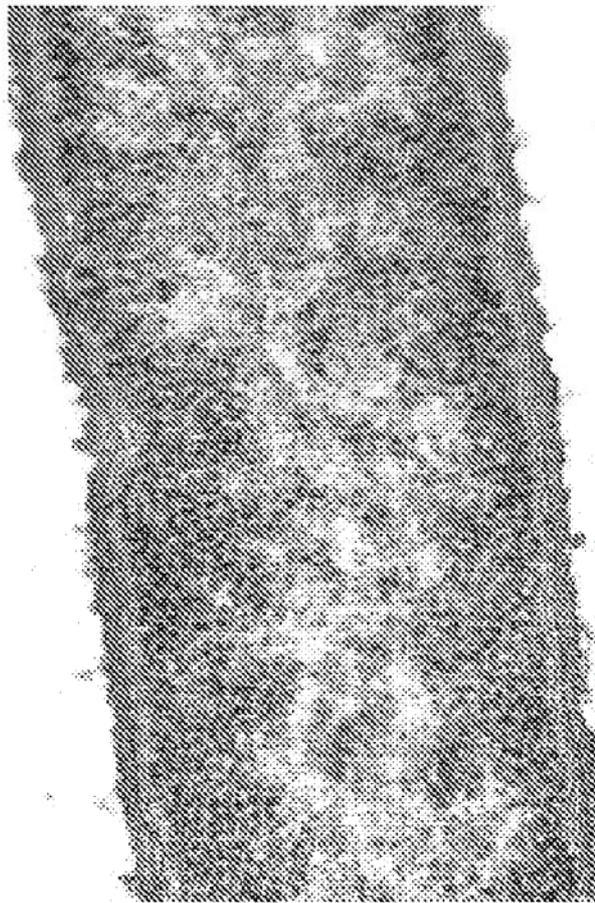


FIG. 4B (Técnica anterior)

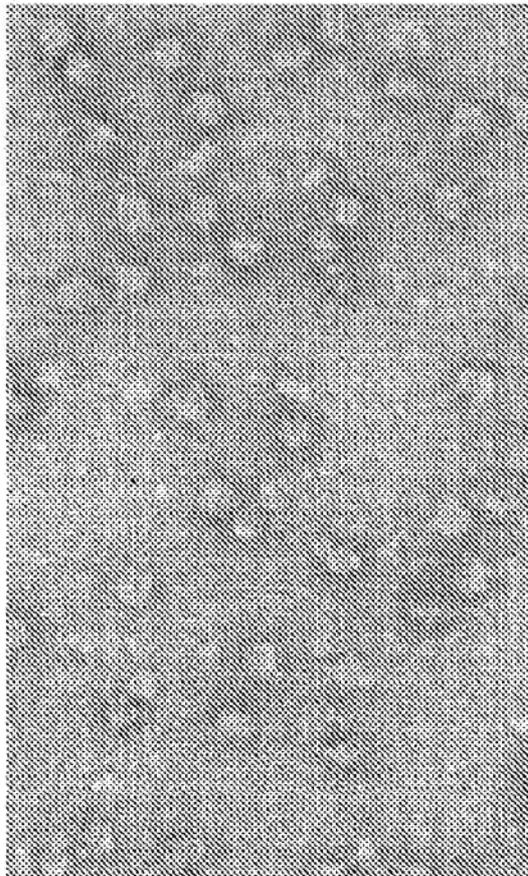
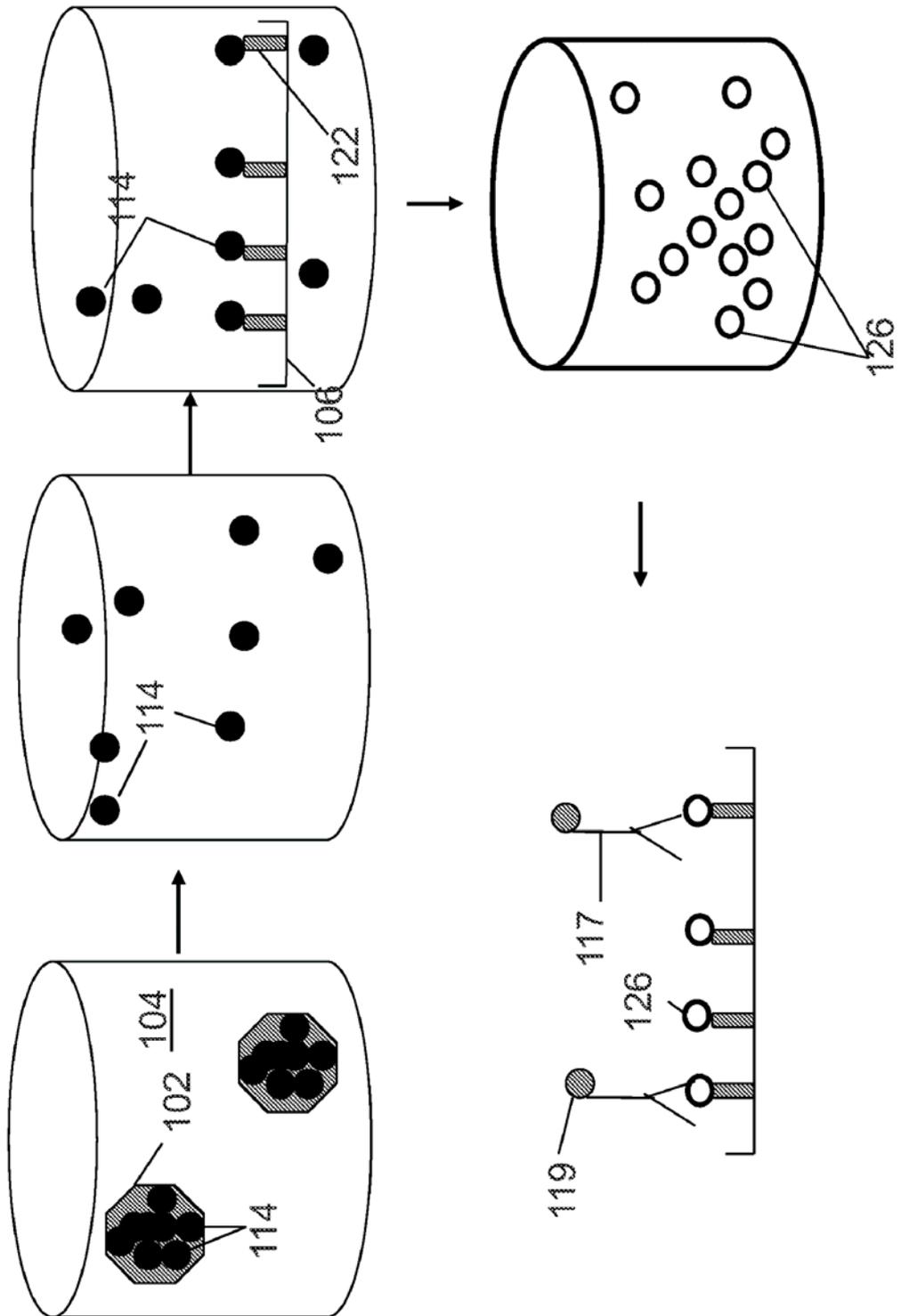


FIG. 6



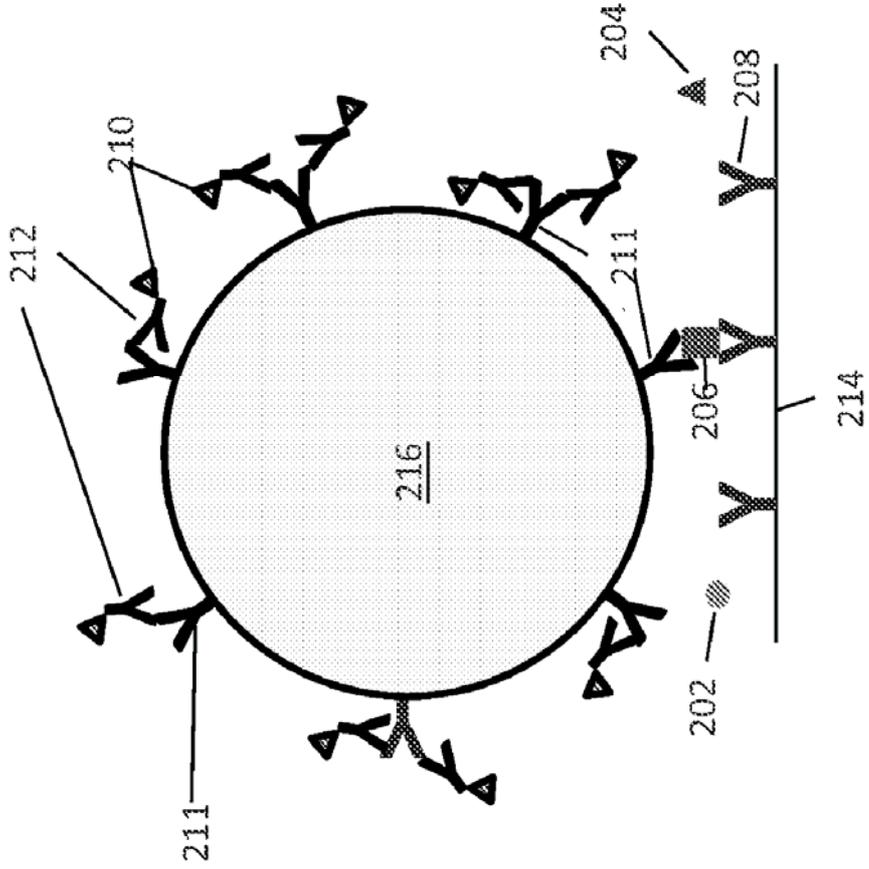


FIG. 7B

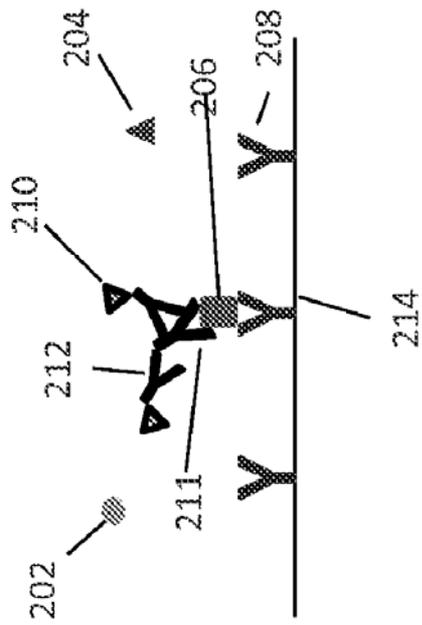


FIG. 7A

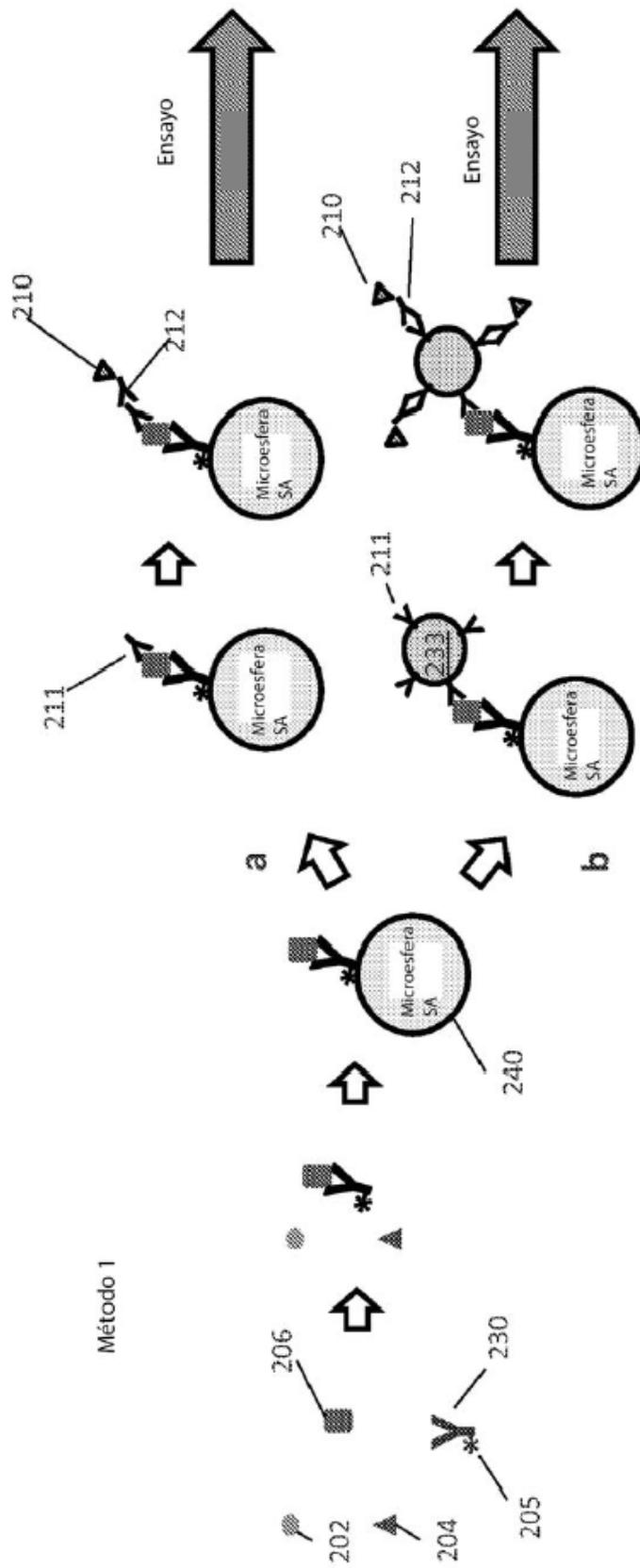


FIG. 8A

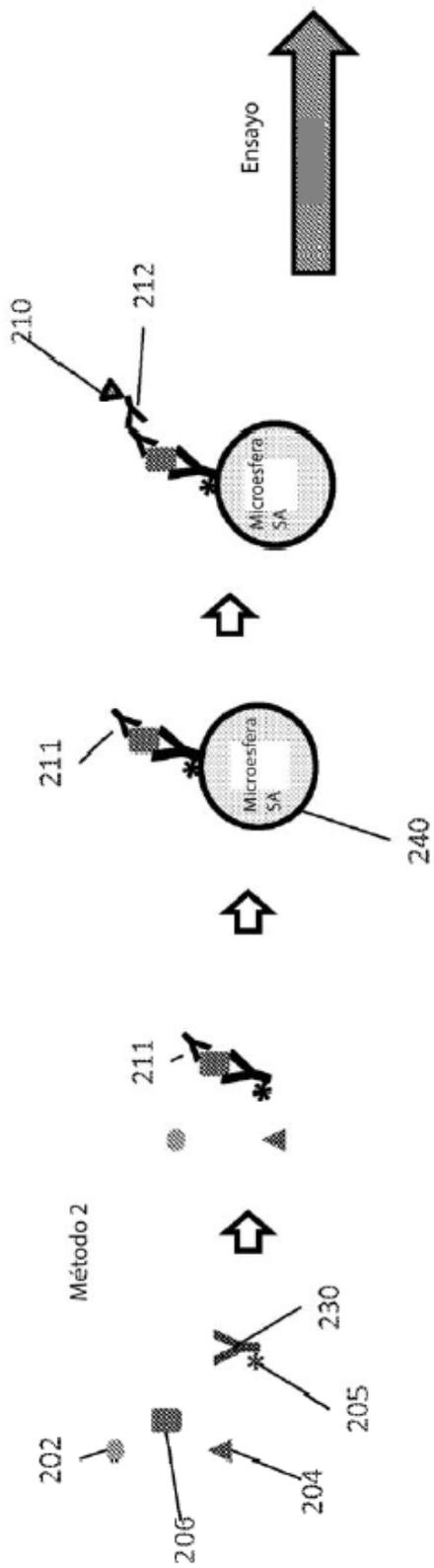


FIG. 8B

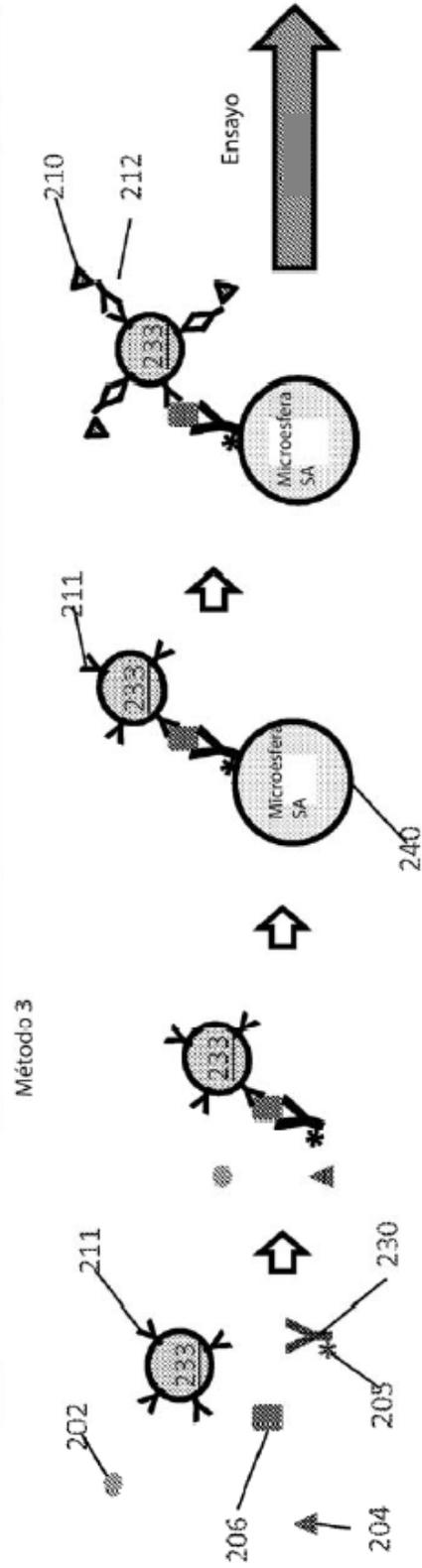
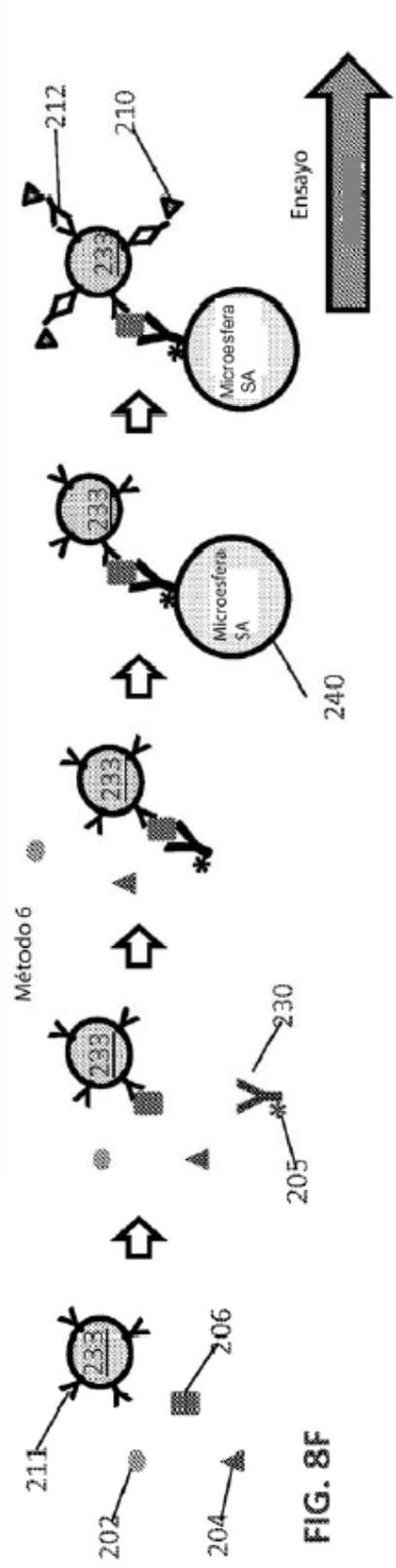
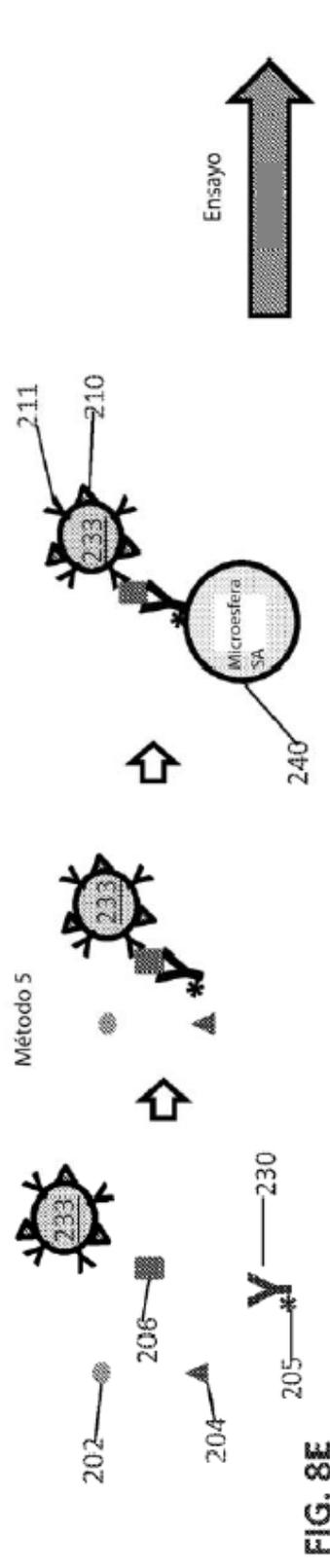
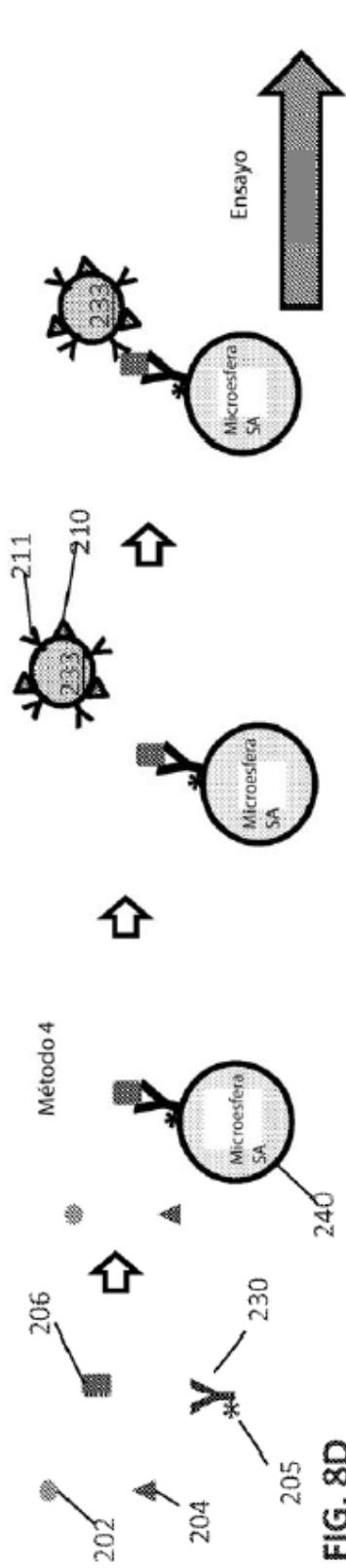


FIG. 8C



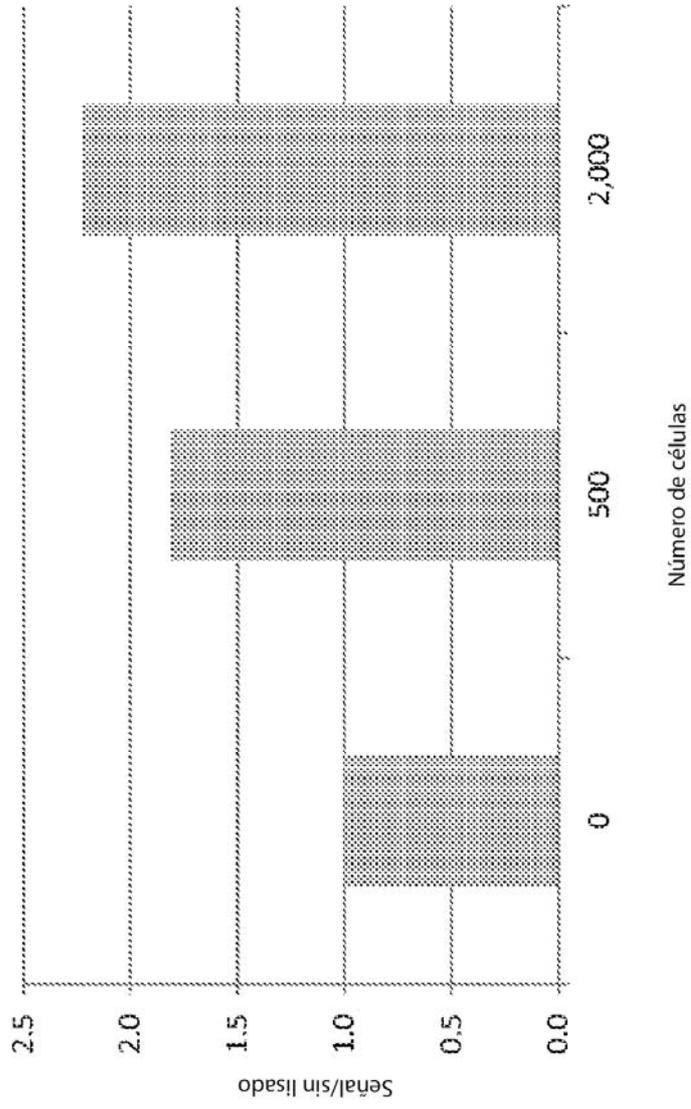


FIG. 9

FIG. 10A

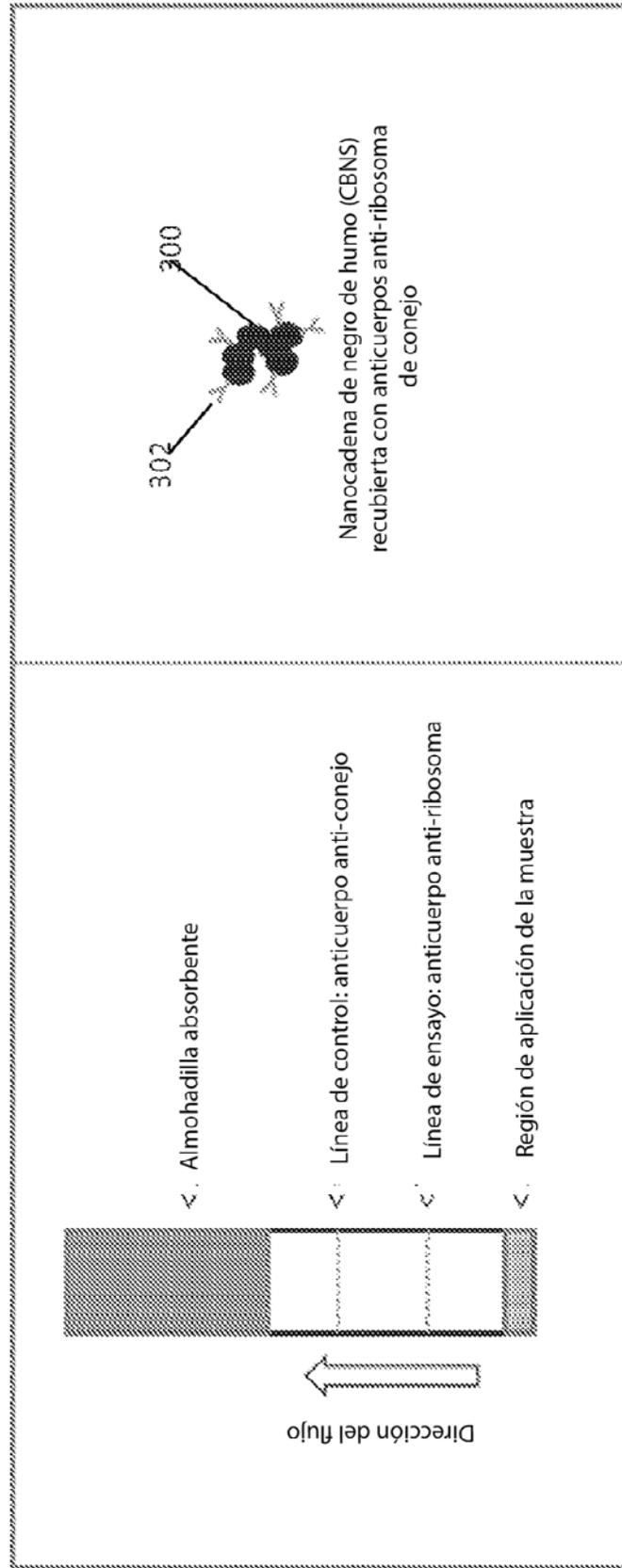
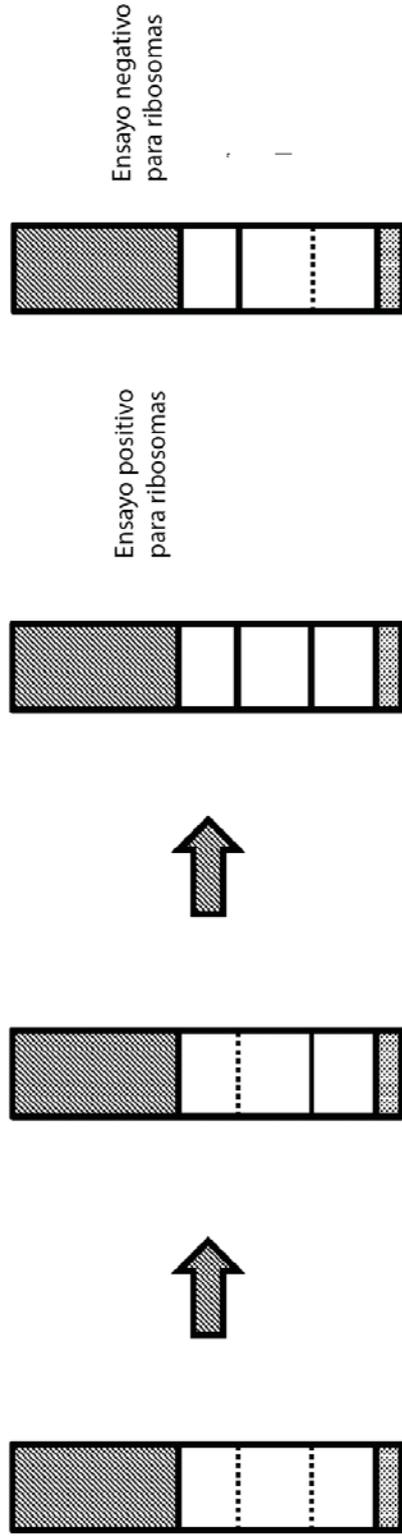


FIG. 10B



1. Aplicación de la muestra que contiene ribosomas
2. Los ribosomas se unen a la línea de ensayo (no visible)
3. Aplicación de CBNS + Ab a la tira
-> Ab se une a ribosomas en la línea de ensayo y el exceso de CBNS migra hasta la línea de control. El resultado positivo/negativo se puede comprobar visualmente en las tiras.

FIG. 10C

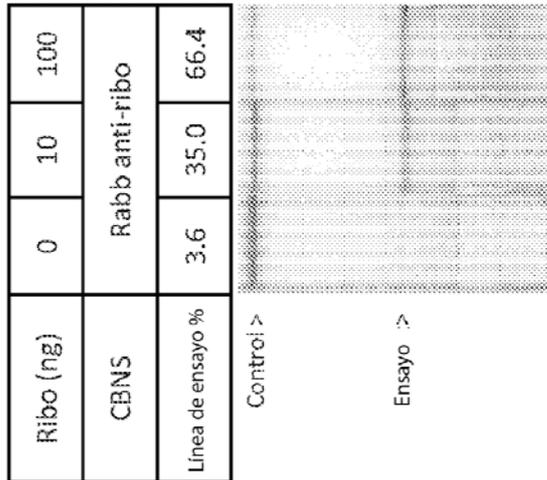
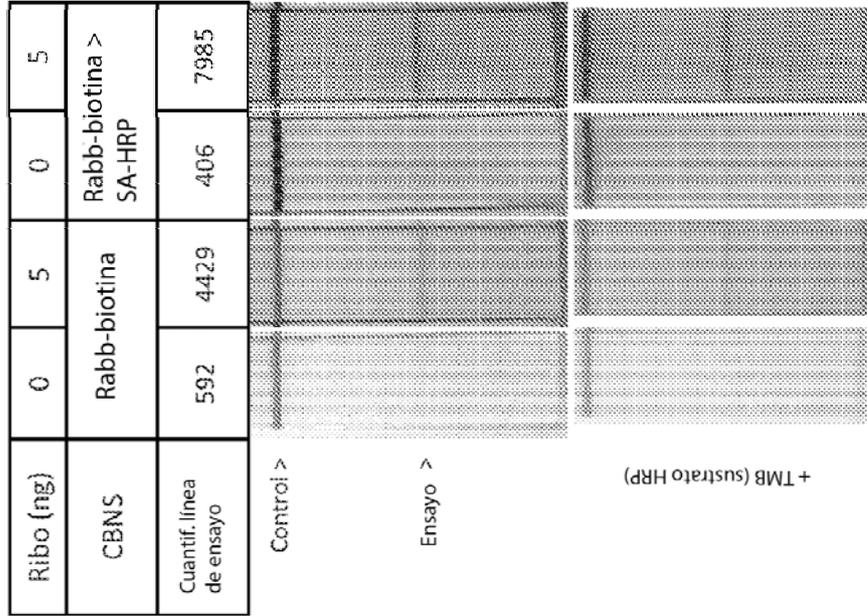


FIG. 10D



+ TMB (sustrato HRP)

FIG. 11

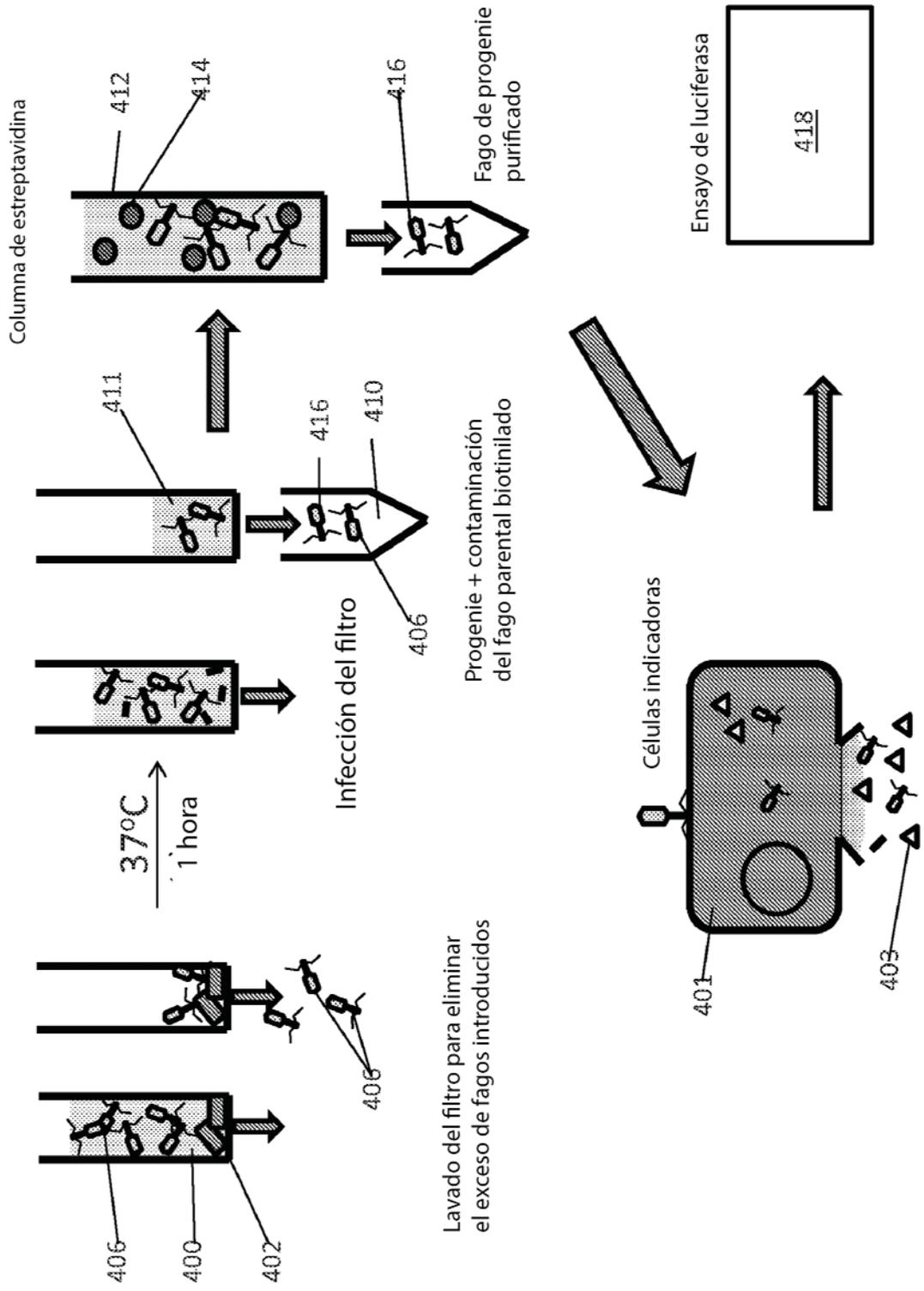


FIG. 12A

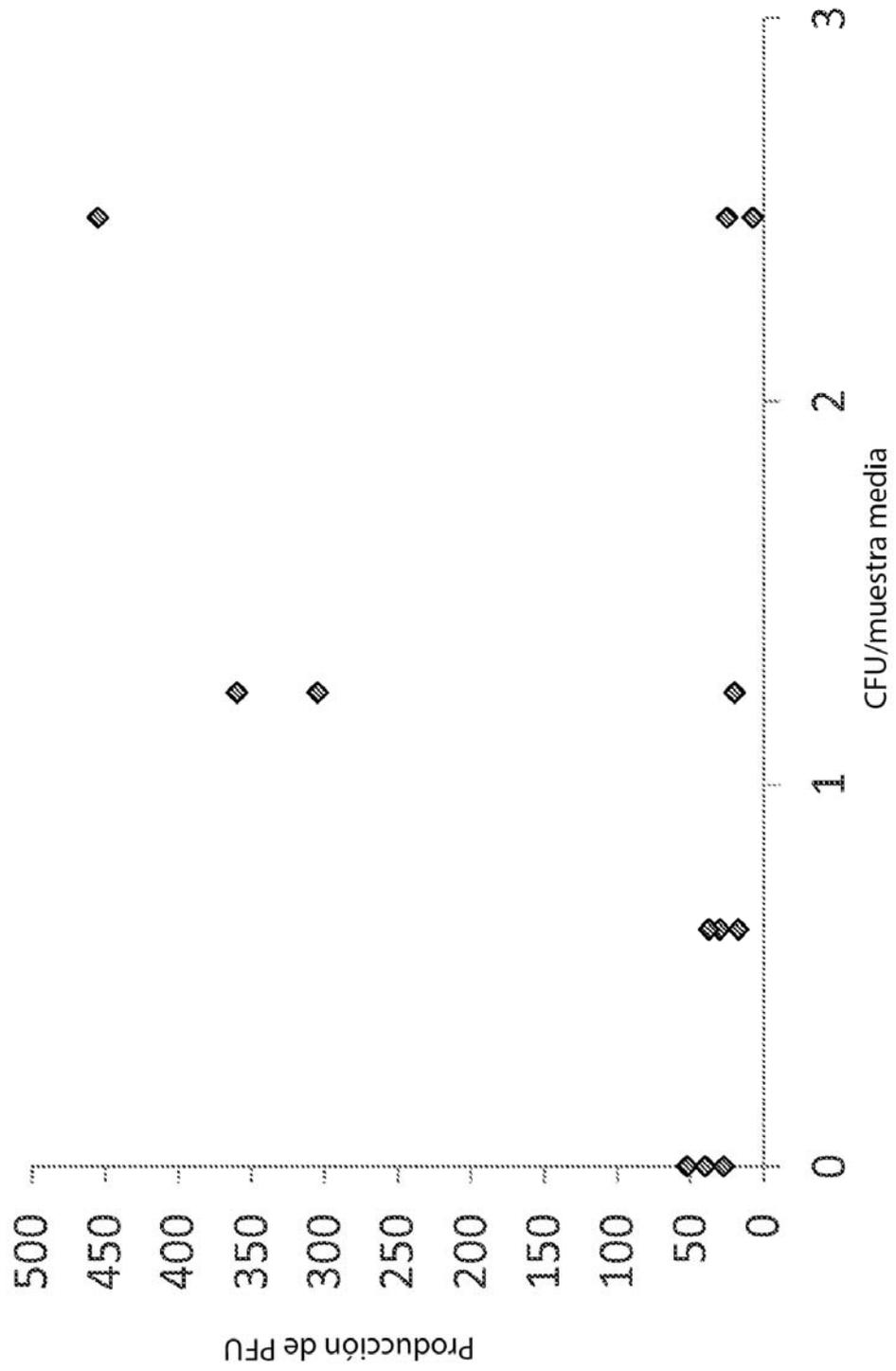
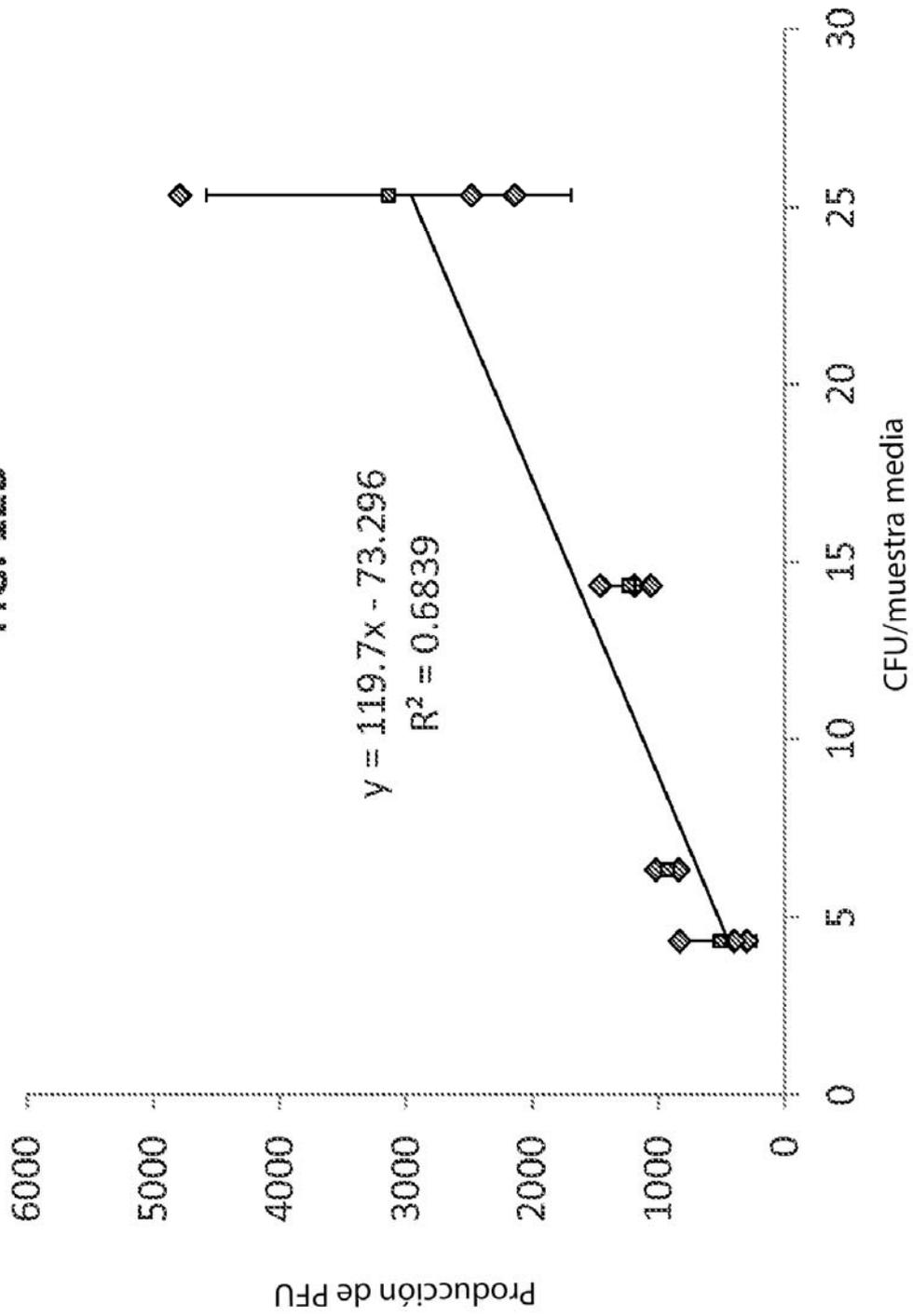
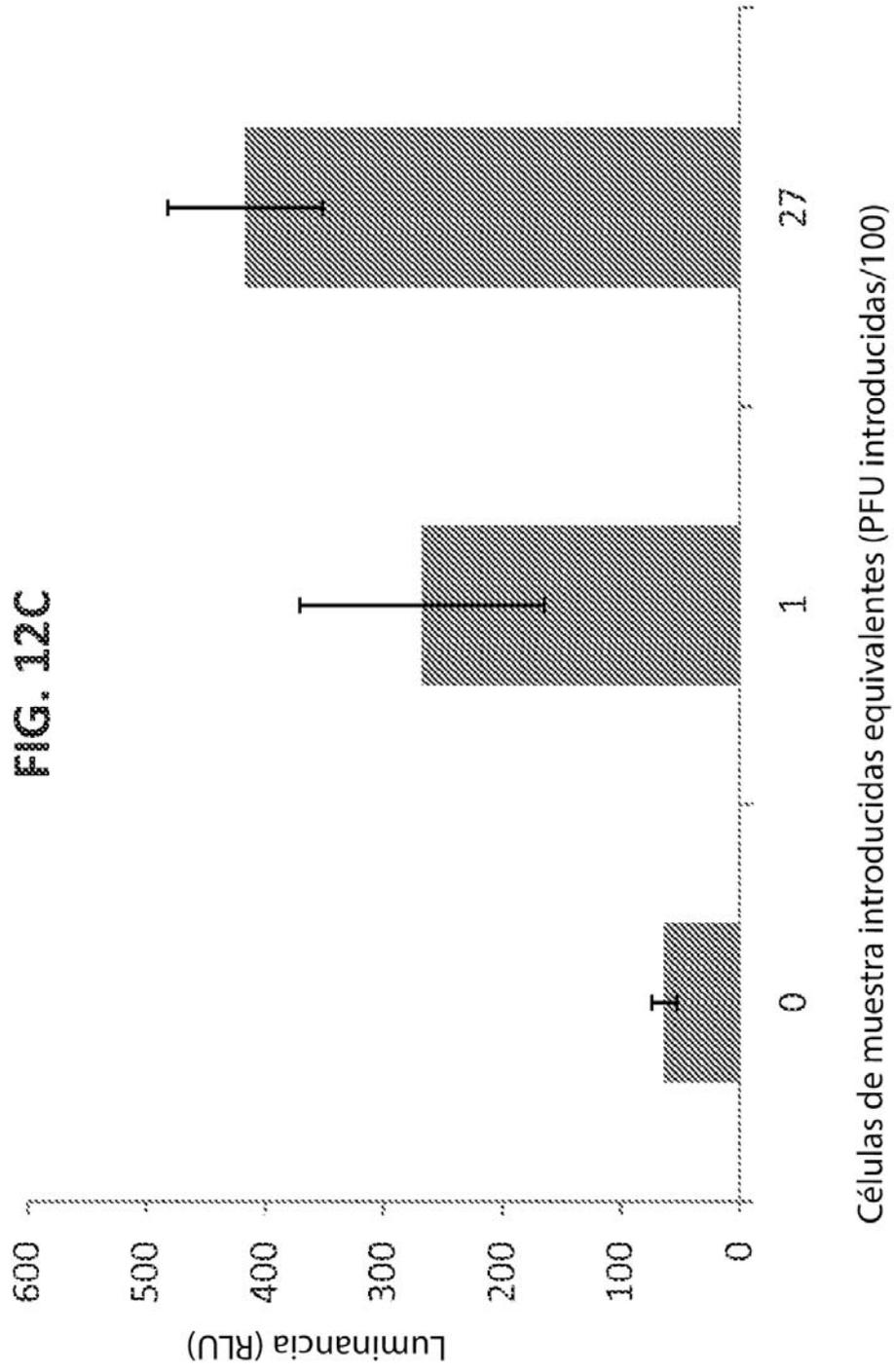
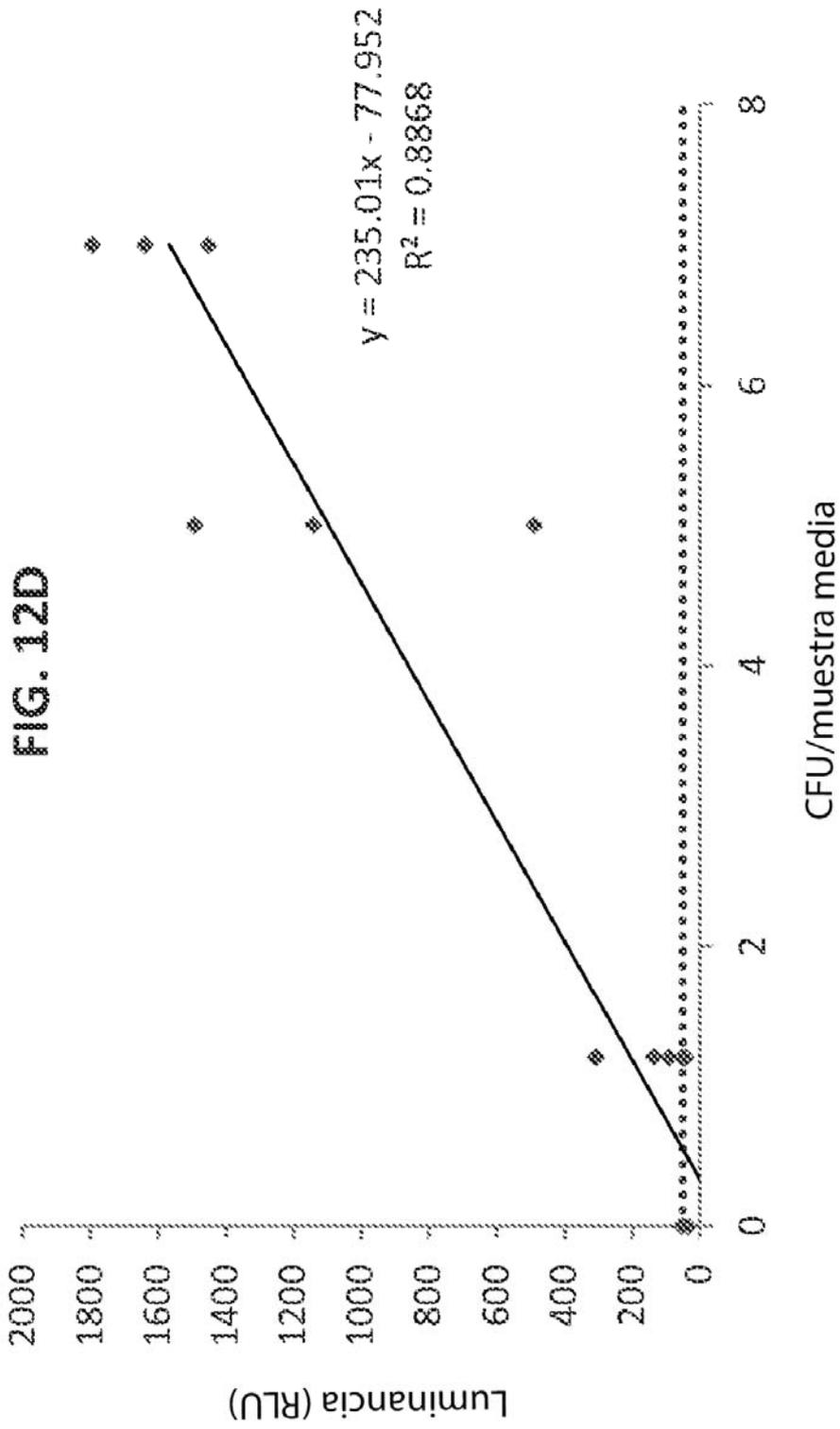


FIG. 12B







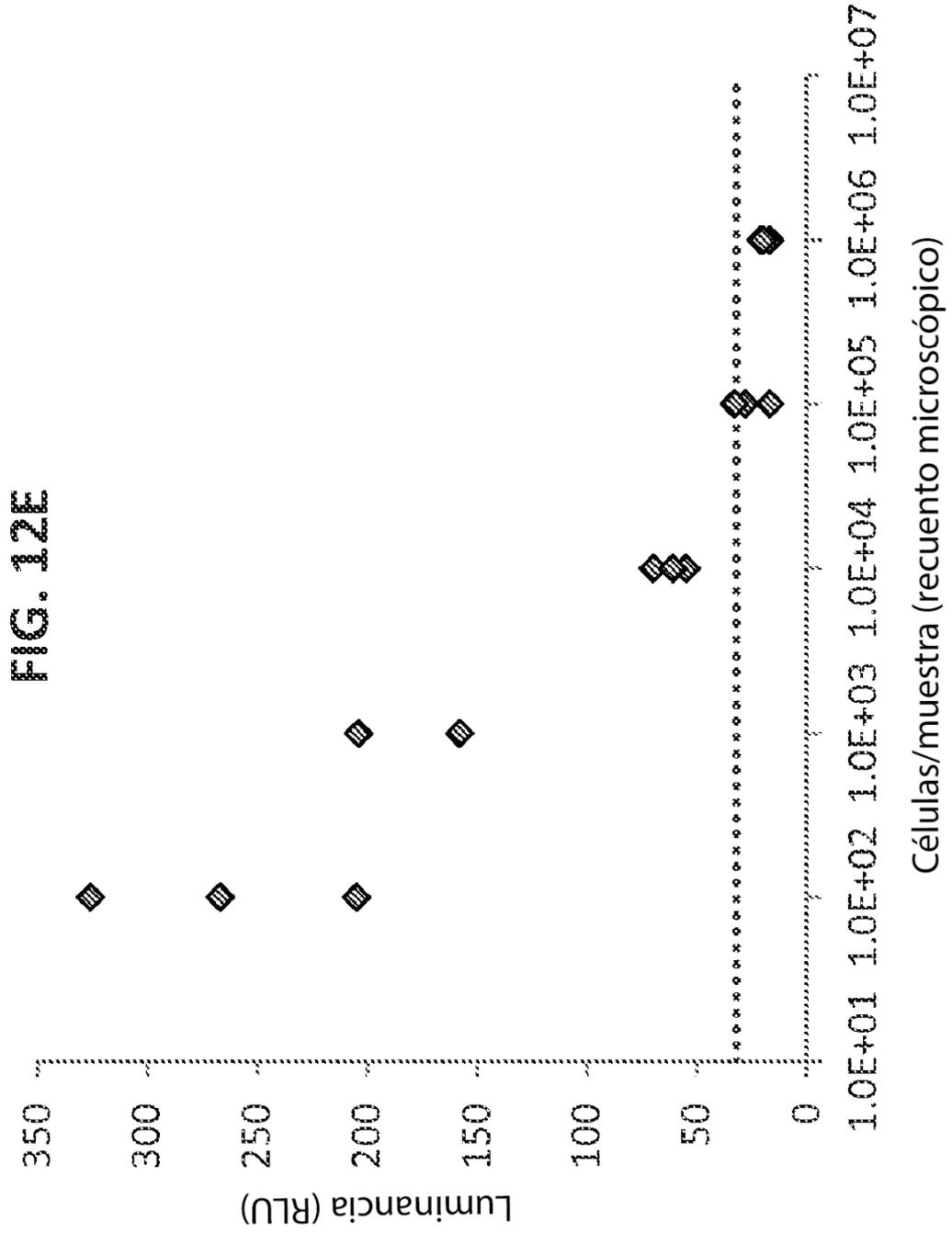


FIG. 13

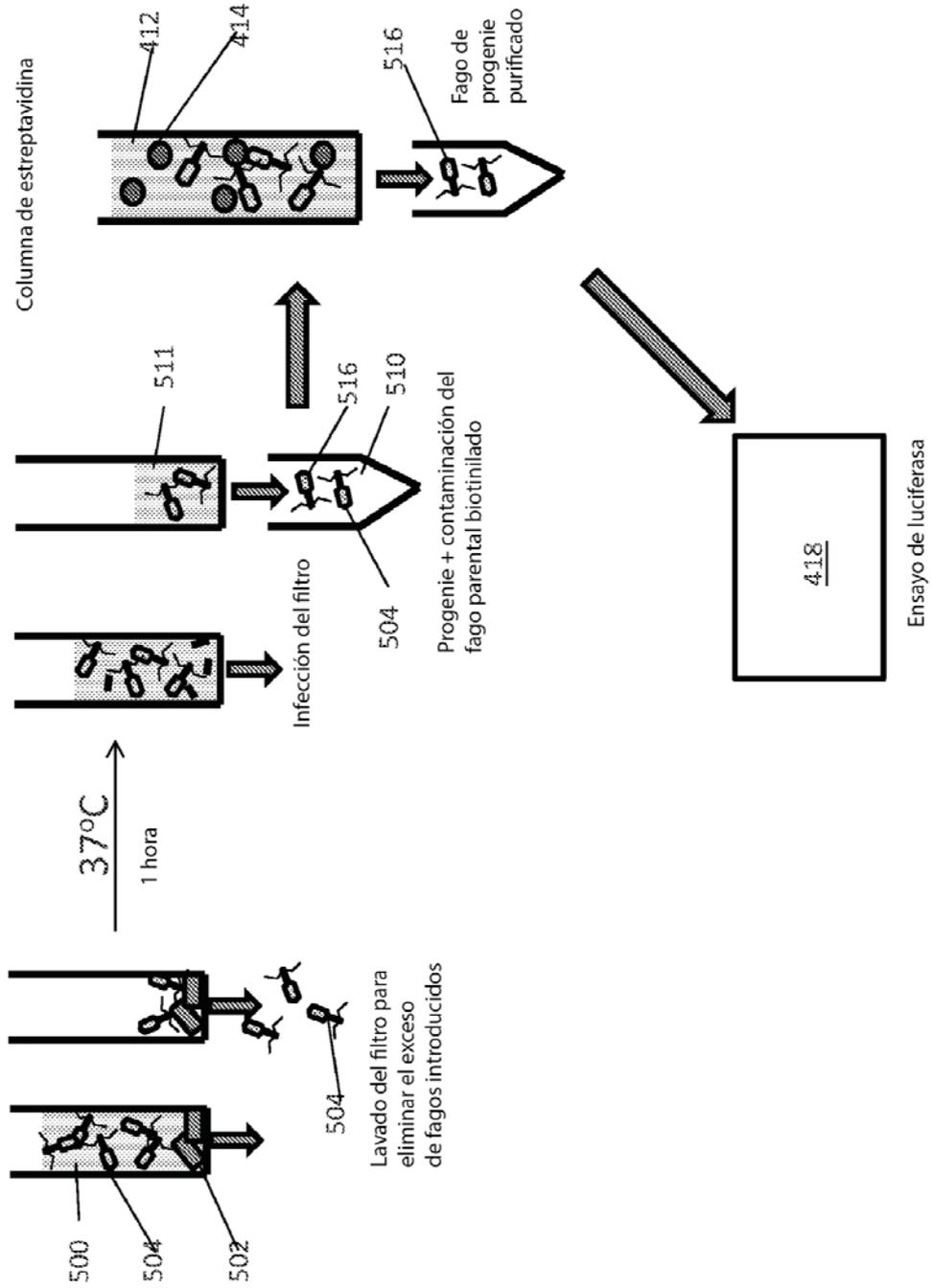


FIG. 14

