



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 237 272**

⑫ Número de solicitud: 200300670

⑮ Int. Cl.7: **G01N 33/569**
G01N 33/544

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **21.03.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2005**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.07.2005

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑱ Inventor/es: **Molina Bolívar, José Antonio;**
Peula García, José Manuel y
Rojas González, Almudena

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Reactivo de látex para la detección de anticuerpos frente a *Legionella pneumophila*.**

㉑ Resumen:

Reactivo de látex para la detección de anticuerpos frente a *Legionella pneumophila*.

Se describe un procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila* en muestras serológicas, mediante aglutinación-sedimentación de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Legionella pneumophila*. Asimismo se describe el método de obtención de las partículas de látex sensibilizadas y el tampón de reacción donde se desarrolla la inmunorreacción.

El desarrollo del inmunodiagnóstico tiene lugar en pocillos de una placa de microtitulación mezclando las partículas sensibilizadas con muestras de sueros humanos en un tampón de reacción específico. La presencia de anticuerpos se detecta mediante la aglutinación de las partículas de látex sensibilizadas y la ausencia se detecta mediante la sedimentación de éstas partículas.

Este test es económico, técnicamente simple, tiene una elevada estabilidad temporal y unos niveles de sensibilidad y especificidad adecuados, de acuerdo con las técnicas serológicas de referencia

ES 2 237 272 A1

DESCRIPCIÓN

Reactivo de látex para la detección de anticuerpos frente a *Legionella pneumophila*.

5 Objeto de la invención

Obtención de un reactivo de aglutinación-sedimentación de partículas de látex para la detección y titulación de sueros que contienen anticuerpos humanos frente a *Legionella pneumophila*. El reactivo comprende partículas de poliestireno coloreadas y sensibilizadas con antígeno de *Legionella pneumophila*, capaces de aglutinar de forma específica en presencia de anticuerpos humanos frente a *Legionella pneumophila*, y un medio de reacción que favorece el proceso de aglutinación-sedimentación de las partículas sensibilizadas. El reactivo permite indicar la positividad o negatividad de un suero así como su titulación.

15 Sector de la técnica

La invención consistente en un test de aglutinación-sedimentación de partículas de látex coloreadas es un método muy útil para detectar la presencia de inmunoquímicos como los anticuerpos en una muestra biológica. Se enmarca dentro del área de la biotecnología, y presenta aplicación directa en el inmunodiagnóstico serológico.

20 Antecedentes

La interacción antígeno-anticuerpos es la base de todos los métodos inmunológicos. Proteínas especiales llamadas anticuerpos son producidas por los mamíferos como respuesta a la presencia de un cuerpo extraño conocido como antígeno. Esta respuesta normal del cuerpo ante un agente patógeno ha permitido el desarrollo de numerosas técnicas que se usan para diagnosticar enfermedades. En algunos de estos tests la presencia del antígeno sospechado se pone de manifiesto añadiendo a la muestra biológica el anticuerpo complementario. Si el antígeno está presente las reacciones antígeno-anticuerpos que se producen originan un precipitado que generalmente es muy difícil de detectar visualmente debido a su pequeño tamaño. Por esta razón los antígenos o anticuerpos se unen a partículas de látex de forma que los precipitados o agregados formados por las reacciones antígeno-anticuerpo entre distintas partículas de látex sean grandes y se detecten visualmente con facilidad.

La aglutinación de partículas de látex sensibilizadas constituye uno de los métodos de inmunodiagnóstico más simples y rápidos. En un inmunoensayo de este tipo, las partículas de látex en cuya superficie se ha adsorbido un anticuerpo (o antígeno) se mezclan con la muestra a analizar y que contiene el antígeno específico correspondiente (o anticuerpo). La existencia de reacciones antígeno-anticuerpo cruzadas entre partículas de látex conduce a la aglutinación del coloide que se puede observar visualmente por el operador.

Los primeros inmunoensayos fueron realizados por Singer y Plotz¹ al detectar el factor reumatoide en el suero humano mediante partículas poliméricas recubiertas de inmuno-gammaglobulina G (IgG).

En la actualidad esta técnica es ampliamente utilizada en química clínica habiéndose aplicado para la detección de más de 80 enfermedades infecciosas, incluyendo el SIDA. De igual forma, existen reactivos comerciales repartidos en disciplinas como son alergias, test de embarazo, detección de cáncer, marcadores tumorales o hepáticos, pruebas tiroideas, identificación y cuantificación de numerosas sustancias como las hormonas, etc.²

Legionella pneumophila es una bacteria gram-negativa que ha alcanzado el rango de importante patógeno humano. Es responsable de un amplio espectro clínico de enfermedades que abarca desde infecciones asintomáticas o enfermedades respiratorias suaves, hasta neumonías fulminantes (enfermedad del legionario)³⁻⁵.

Según estudios del Grupo Europeo de Trabajo en Infecciones por *Legionella*⁶ la fuente de infección puede ser determinada en aproximadamente la mitad de los casos. Alrededor de un tercio son adquiridas en comunidad, otra tercera parte asociadas a viajes y el otro tercio de origen hospitalario. La enfermedad tiende a afectar a personas de mediana y avanzada edad y el riesgo se incrementa en pacientes con varios tipos de inmunodepresión (cáncer, diabetes, enfermedades renales, SIDA). La mortalidad para pacientes sanos tratados es de alrededor del 5%, pero puede ser mayor para pacientes no tratados. Este índice puede subir hasta el 20% en pacientes inmunodeprimidos⁷. Esta bacteria reside en una gran variedad de medios acuáticos naturales, lagos o balnearios; y artificiales, piscinas públicas o sistemas acuosos de edificios como dispositivos de climatización y sus correspondientes torres de refrigeración⁸. Este microorganismo es relativamente resistente a los efectos de la cloración y del calentamiento. Según los datos de que se dispone, el medio más común de transmisión es la inhalación directa de aerosoles procedentes de aguas contaminadas y no se ha evidenciado contagio directo por contacto entre personas⁴. Las infecciones por *Legionella* pueden ser esporádicas o epidémicas. Hay una gran variabilidad geográfica en la frecuencia de infección. En todos los casos es más común en los meses cálidos, quizás debido a las torres de refrigeración que generan aerosoles.

La especie *Legionella pneumophila* es responsable de entre el 80-95% de las infecciones en humanos por *Legionella*. Ésta presenta 15 serogrupos patógenos para el ser humano. El serogrupo 1 es el responsable de entre el 50-75% de las infecciones causadas por ésta especie^{6,9}. Este hecho es muy importante desde el punto de vista de los procedimientos de diagnóstico.

El diagnóstico en el laboratorio de infecciones por *Legionella* es considerado normalmente problemático. La razón de esta consideración es que todos los métodos de detección existentes tienen sus limitaciones y no se ha conseguido desarrollar hasta el momento un método universal de diagnóstico para *Legionella*^{10,11}. Por ello ninguno de los métodos cubre todas las posibilidades. Este hecho conduce a sensibilidades en la detección que están entre el 60-70% y que no supera el 90% para ninguno de los test “clásicos”. La disponibilidad de un buen repertorio de técnicas de diagnóstico constituye la base para tomar las medidas efectivas para conseguir la prevención y el control mediante un rápido reconocimiento de futuras infecciones por *Legionella*.

Según Pouffle y col.¹² se puede confirmar un caso de legionelosis con un diagnóstico clínico en combinación con:
 1) un cultivo positivo, 2) detección mediante técnicas serológicas de una elevación del título de anticuerpos específicos en cuatro diluciones de muestras pareadas de suero, o 3) un resultado positivo en un test de detección de antígeno en orina.

De acuerdo con el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, un diagnóstico positivo puede tener confirmación en el laboratorio siguiendo alguno de los siguientes criterios¹³

- 1) Aislamiento de *Legionella* en secreciones respiratorias, muestras de tejido pulmonar o sangre.
- 2) Detección de una elevación del título de anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila* (sg1) en cuatro diluciones de muestras pareadas de mediante IFA (Inmunofluorescencia indirecta)
- 3) Detectando *Legionella pneumophila* (sg1) en secreciones respiratorias, tejido pulmonar o fluido pleura mediante fluorescencia directa de anticuerpos.
- 4) Demostrando la presencia de antígenos de *Legionella pneumophila* (sg 1) en orina mediante radioinmunoensayo o ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

Según el Grupo Europeo de Trabajo para Infecciones por *Legionella*, los casos pueden tener confirmación microbiológica según alguno de estos criterios¹⁴:

- 1) Aislamiento de *Legionella* en secreciones respiratorias, muestras de tejido pulmonar o sangre.
- 2) Detección de una elevación del título de anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila* (sg1) en cuatro diluciones de muestras pareadas mediante IFA o microaglutinación.
- 3) Detección de antígenos específicos de legionella en orina utilizando reactivos validados.

Una presunción microbiológica puede tenerse según:

- 1) Detectando una elevación del título de anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila* (sg1) en cuatro diluciones de muestras pareadas de otros serogrupos de *Legionella pneumophila* u otras especies de *Legionella* mediante IFA o microaglutinación.
- 2) Detectando un título simple elevado de anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila* (sg 1) u otros serogrupos, u otras especies de *Legionella*.
- 3) Detectando antígenos específicos de *Legionella* en secreciones respiratorias, o permanencia del microorganismo mediante inmunofluorescencia directa de anticuerpos (DFA) utilizando reactivos monoclonales evaluados.
- 4) Detectando ADN de especies de *Legionella* mediante PCR.

Maiwald y col.¹⁰ proponen un esquema para el diagnóstico en el laboratorio para casos en los que se sospeche una infección por *Legionella*. Se recomienda obtener tres tipos de muestras (tejido pulmonar o secreciones respiratorias, Orina y suero) en paralelo para su evaluación. El diagnóstico en un solo método puede conducir a resultados negativos que sean falsos. Si dos o más métodos conducen a resultados negativos, entonces se podría descartar la infección por *Legionella*.

Aunque el cultivo y aislamiento del microorganismo es el indicador preferido para confirmar la infección, su utilización presenta diversos inconvenientes. Entre estos destacan el dificultoso crecimiento de esta bacteria en medios artificiales y la disponibilidad de muestras adecuadas. Por ello, la sensibilidad de esta técnica¹⁵ puede abarcar un amplio intervalo que va desde el 10 al 80%.

Los antígenos específicos de *Legionella pneumophila* se pueden detectar en muestras de orina mediante radioinmunoensayos (RIA), ELISA o aglutinación de látex¹⁶. Estos métodos son simples, no invasivos, rápidos y con sensibilidad y especificidad aceptables. Sin embargo también presentan algunos inconvenientes como una posible persistencia en la excreción de antígeno que no se corresponde con un infección desde un punto de vista clínico o la disminución de la sensibilidad para serogrupos distintos del 1¹¹. Otra desventaja es la utilización de radioquímicos en el caso de RIA,

o la necesidad de disponer de anticuerpos específicos para la fabricación de los reactivos de látex lo que se refleja en el incremento del coste de los equipos. Finalmente, el uso de equipos costosos y personal altamente cualificado puede suponer otro aspecto negativo.

La Organización Mundial de la Salud en su Registro epidemiológico semanal¹⁷ revela que de todos los casos de Legionelosis diagnosticados en Europa en 1999, un 32% de los casos fueron determinados mediante técnicas o serológicas (seroconversión y detección de un título simple elevado), mientras que en un 17% se realizó el aislamiento de la bacteria, en un 45% se utilizó la detección de antígeno en orina y en el 6% restante otras técnicas distintas. La tendencia en la última década es un incremento importante en el uso como técnica de diagnóstico de la detección de antígeno en orina^{18,19}. Sin embargo, también se ha constatado una disminución importante de sensibilidad, 40-50%, en esta técnica en casos de neumonías poco severas, por lo que parece recomendable su uso junto a otras técnicas de diagnóstico²⁰.

La serología es otra de las técnicas frecuentemente utilizadas en el diagnóstico de infecciones por *Legionella pneumophila*. Dentro de este grupo se pueden incluir Inmunofluorescencia indirecta (IFA), técnicas enzimáticas (ELISA) y técnicas de microaglutinación^{15,21}. Estas técnicas presentan una adecuada sensibilidad (85%) y especificidad (95%). Son técnicas útiles desde un punto de vista epidemiológico. La facilidad de obtención de muestras y la detección de infecciones poco severas o asintomáticas son otras de sus ventajas. Sin embargo, presenta diversos inconvenientes como la alta prevalencia de anticuerpos en la población, y la seroconversión a las 4-8 semanas. Además un 20% de los pacientes no muestra un nivel adecuado de anticuerpos para su correcta detección con procedimientos serológicos.

La incorporación de la detección de IgM conjuntamente con IgG mejora la sensibilidad y ayuda a detectar la presencia de una infección por *Legionella*, facilitando un diagnóstico más rápido^{10,22}.

De entre estos métodos serológicos, IFI y técnicas enzimáticas (ELISA), son procedimientos que, con la sensibilidad y especificidad adecuadas, requieren de personal altamente especializado y equipos costosos. Otro método bastante más barato, rutinario y que no necesita tecnología especializada, consiste en un test de aglutinación de látex. Estas partículas son recubiertas por un grupo proteico de la membrana externa de *Legionella pneumophila*²³⁻²⁵. Es un procedimiento muy simple pero se ve reducida la sensibilidad y es difícil realizar una cuantificación de anticuerpos o titulación del suero. También se puede utilizar las técnicas de microaglutinación de partículas²⁶⁻²⁹. Estos procedimientos son sencillos de realizar y proporcionan una sensibilidad y especificidad adecuadas. El proceso de aglutinación-sedimentación de partículas de látex sensibilizadas con antígeno de *Legionella pneumophila*, se puede incluir dentro de este tipo de técnicas, ya que combina el uso de la aglutinación de partículas de látex, recubiertas por un antígeno bacteriano de carácter lipopolisacárido, con la sedimentación de éstas en pocillos de microplacas.

Referencias

1. Singer y C.M. Plotz. (1956). *Amer. J. Med.*, 21, 888.
2. L. Borque. (1992). *Boletín Bibliográfico Behring*. 6, 13.
3. V.L. Yu, F.J. Kroboth, J. Shonnard et al. (1982) *Am. J. Med.*, 73, 357.
4. J.E. Stout, V.L. Yu, Y.C. Yee, S. Vaccarello, W. Diven, T. C. Lee. (1992) *Epidemiol. Infect.* 109, 49.
5. J. Roig, C. Domingo, J. Morera. (1994) *Chest*, 105, 1817.
6. C.A Joseph and C. Lane. (1997) 12th Meeting of the European Working Group on Legionella Infections.
7. P.H. Edelstein. (1995). *Clinical Infectious Diseases*, 21, 265.
8. W.C: Winn (1995). *Legionella*. Manual of clinical microbiology, 6th ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 533-544.
9. A.L. Reingold, B.M. Thomason, B.J. Brake, L. Thacker, H.W. Wilkinson, J.N. Kuritsky. (1984). *Infect. Dis.*, 149, 819-9.
10. M. Maiwald, J.H. Helbig, P.C. Luck. (1998). *J. Microbiol. Meth.*, 33, 59.
11. G.W. Waterer, V.S: Baselski, R.G. Wunderink, (2001), *Am. J. Med.*, 110, 41.
12. J. F. Pouffle, T.M. Mile, R.F. Breiman, B.A. Hackmann, S.J. Salstrom, B.J. Marston, B.S. Fields (1995). *Clin. Infect. Dis.*, 20, 1286.
13. U.S. Center for Disease Control, *MMWR*, January 03 (1997), 46, 1.
14. European Working Group for *Legionella* Infections, "Scientific case definition" www.ewgli.org (2002).

15. F.G. **Rodgers**, A.W. **Pascuale**, (1991). Manual of clinical microbiology, 5th ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 442-453.

16. R. **Cosentini**, P. **Tarsia**, F. **Blasi**, E. **Roma**, L. **Allegra** (2001) *Monaldi Arch. Chest. Dis.*, 56, 527.

17. "Weekly Epidemiological Record", World Health Organization, (2000), 75 (43), 345.

18. A.L. **Benin**, R.F. **Benson**, R.E. **Besser**, (2002), *Clin. Infect. Dis.*, 35(9), 1039.

19. D.R. **Murdoch** (2003), *Clin. Infect. Dis.*, 36(1), 64.

20. E.P. **Yzerman**, J.W. **den Boer**, K.D. **Lettinga**, J. **Schellekens**, J. **Dankert**, M. **Peeters**, (2002), *J. Clin. Microbiol.*, 40(9), 3232.

21. C.E. **Farshey**, D.D. **Cruce**, G.C. **Klein**, (1979). *Ann. Intern. Med.*, 90, 690.

22. F. **Ory**, J.M. **Echevarría**, C. **Peláez**, A. **Téllez**, M.A. **Mateo**, J. **López**, (2000). *Clinical Microbiology and Infection*, 6(2), 64.

23. A.C. **Sedgwick**, R.C. **Tilton**, (1983), *J. Clin. Microbiol.*, 17, 365

24. B.V. **Eruslanov**, (1990), USSR Author certificate N° 1614494.

25. V. **Borzencov**, B. **Eraslunov**, E.H. **Svetoch**, E.H. **Pecherskikh**, (1998), Patente N° RU2124208.

26. K. **Lind**, M. **Collins**, O.I. **Aalund** (1984), *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand [B]*, 92, 159.

27. S. **Bazovska**, M. **Spalekova**, (1994), *Bratisl. Lek. Listy*, 95, 515.

28. T.C. **Boswell**, (1996), *J. Clin. Pathol.*, 49, 584.

29. K. **Takeda**, H. **Murakami**, Y. **Ishii**, N. **Furuya**, T. **Matsumoto**, K. **Yamaguchi**, (1998), *Clinical of Medical Microbiology*, 47, 325.

Explicación de la invención

La presente invención consiste en un procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila* presentes en muestras serológicas, mediante la aglutinación-sedimentación de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipopolisacárido (LPS) de *Legionella pneumophila*. El desarrollo del inmunodiagnóstico tiene lugar en los pocillos de una placa de microtitulación mezclando las partículas sensibilizadas con muestras de sueros humanos en un tampón de reacción específico. La presencia en el suero de anticuerpos frente *Legionella pneumophila* se detecta mediante la aglutinación de las partículas de látex sensibilizadas. La ausencia de anticuerpos específicos se detecta mediante la sedimentación de éstas partículas.

El test presenta dos componentes:

A) Partículas de látex sensibilizadas con antígeno de *Legionella pneumophila* y bloqueadas con albúmina de suero bovino.

B) Una solución (un tampón) que constituye el medio de la reacción inmunológica.

El procedimiento de obtención de las partículas de látex sensibilizadas con antígeno de *Legionella pneumophila* esencialmente comprende los siguientes pasos:

- sensibilización de las partículas de látex mediante el recubrimiento de las mismas con un lipopolisacárido (LPS) de *Legionella pneumophila*, previamente obtenido de un extracto crudo de estos microorganismos. El recubrimiento de las partículas con este antígeno lipopolisacárido de *Legionella pneumophila* se consigue mediante un proceso de adsorción física.

- bloqueo de las partículas de látex, ya sensibilizadas, con albúmina de suero bovina (BSA) por un proceso de adsorción física en la superficie polimérica de las partículas de látex.

El tampón de reacción es una solución de los siguientes componentes: Glicina, NaCl u otra sal de cationes monovalentes, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), Albúmina de suero bovino (BSA) y NaN₃. Este tampón sirve para favorecer la interacción inmunológica y consecuentemente la aglutinación específica de las partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila* en presencia de anticuerpos específicos frente a *Legionella pneumophila*, y también para minimizar la aparición de interacciones inespecíficas con lo que se consigue una adecuada sedimentación de las partículas que no aglutinan específicamente en ausencia de estos anticuerpos específicos.

Este test de inmunodiagnóstico es económico, técnicamente simple, tiene una elevada estabilidad temporal y presenta unos niveles de sensibilidad y especificidad adecuados, de acuerdo con IFA, que puede considerarse la técnica de referencia desde un punto de vista serológico.

5 Explicación de las figuras

Fig. 1. Imagen de los pocillos de la placa de microtitulación tras la inmunoreacción.

Resultado positivo: El suero contiene anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila*. Las partículas de látex aglutinan y una fina capa de partículas recubre la totalidad del fondo de los pocillos.

Resultado negativo: En el suero hay ausencia de estos anticuerpos específicos. Las partículas permanecen en suspensión y sedimentan de forma discreta apareciendo un botón en el centro del fondo del pocillo.

15 Fig. 2. Imagen de la titulación de un suero en la microplaca con pocillos.

Descripción detallada de la invención

20 El procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila* presentes en muestras serológicas, objeto de la invención presenta dos componentes:

A) Partículas de látex sensibilizadas con antígeno de *Legionella pneumophila* y bloqueadas con albúmina de suero bovino.

25 B) Una solución (un tampón) que constituye el medio de la reacción inmunológica.

El primer paso para producir el componente A consiste en la obtención del antígeno de *Legionella pneumophila*. Este antígeno es un lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de este tipo de bacterias. Para su obtención se procede como se indica a continuación:

30 Un extracto crudo de *Legionella pneumophila* envejecida se sonica en baño de hielo durante 10 minutos. Un volumen de este extracto se mezcla con un volumen de una solución reactiva que contiene un 20% de glicerina, 10% de mercaptoetanol, 2% de Dodecil sulfato de sodio (SDS) y una concentración 0,624 M de TRIS-ácido, y que presenta un pH de 6,8. Se eleva la temperatura a 100°C durante 15 minutos. A continuación se realiza una evaluación cuantitativa de la cantidad de proteína total presente en la mezcla mediante cualquier procedimiento adecuado. Posteriormente se 35 añade una cantidad de proteinasa K que sea diez veces menor en peso que la cantidad de proteína total encontrada. La mezcla con proteinasa K se mantiene a 60°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se añaden dos volúmenes de una solución de etanol al 95% que tiene una concentración 0,375 M de cloruro de magnesio, manteniendo esta mezcla a -20°C durante una noche. Finalmente se realiza una centrifugación a 1000G de forma que el precipitado, donde se 40 encuentra el LPS se resuspende en medio volumen de agua desionizada y se dializa frente a agua desionizada durante 24 horas.

Las partículas comerciales de látex coloreadas que se utilizan presentan un diámetro homogéneo alrededor de 800 nm, aunque pueden usarse sistemas con tamaño desde 0,7 μm hasta 1,2 μm . Estas partículas se recubren con LPS de 45 *Legionella pneumophila* mediante un proceso de adsorción física. Una vez sensibilizadas con el antígeno, las partículas se someten a una etapa de bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA), proteína que también resulta adsorbida en la superficie polimérica de las partículas de látex. El procedimiento de obtención de las partículas sensibilizadas, componente A, se desarrolla según las siguientes etapas:

50 1) Un volumen determinado de suspensión comercial de las partículas de látex se lava con 20 volúmenes de tampón fosfato salino (PBS) y se resuspende en este tampón a un 5% de contenido sólido.

2) La suspensión de látex se mezcla con la suspensión de LPS bacteriano a razón de tres volúmenes de látex al 5% con 1 volumen de antígeno y todo ello con 20 volúmenes de PBS. El proceso de adsorción transcurre con agitación 55 por un periodo entre 6 y 12 horas a temperatura ambiente.

3) Finalizada la adsorción, las partículas de látex sensibilizadas se lavan dos veces con 20 volúmenes de tampón fosfato (PB).

60 4) Finalmente las partículas son redispersadas en 20 volúmenes de una solución 3 mM de ácido acético a pH 5 que contiene un 0.05% de BSA. Esta etapa debe extenderse por un periodo de tiempo que oscile entre 5 y 12 horas.

5) Finalmente las partículas sensibilizadas y bloqueadas se lavan dos veces con 20 volúmenes de tampón glicina (GB) a pH 8 y se resuspenden al 0.065% en GB, pH 8 y 0.2 mg/ml de NaN_3 .

65 El componente B es una solución 0.1 M de Glicina a pH entre 8 y 8,5 que tenga una concentración de NaCl (u otra sal de cationes monovalentes) entre 300 y 450 mM, entre 0,1 y 0,15% de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), entre 0,7 y 1% de BSA, y 0,2 mg/ml de NaN_3 . Mediante el uso de este medio se favorece el acercamiento entre partículas y

la interacción inmunológica entre el antígeno inmovilizado en la superficie de éstas y los correspondientes anticuerpos específicos que pudieran estar presentes en el suero humano que se estudia. Además, se minimiza la aparición de interacciones inespecíficas y se consigue una adecuada sedimentación de aquellas partículas sensibilizadas que no aglutinan debido a la ausencia de anticuerpos específicos en los sueros testados.

Una vez disponibles los componentes A y B, el procedimiento para la detección de anticuerpos específicos puede ser el siguiente:

La inmunoreacción se desarrolla en una microplaca con pocillos en U o V. 5 μ l de suero son diluidos en 195 μ l del tampón que constituye el componente B. De esta solución se realizan diluciones dobles en serie hasta alcanzar una determinada titulación del suero, por ejemplo desde 1/80 hasta 1/10250. Se introducen en los pocillos de la placa 30 μ l de cada una de estas diluciones. Después de añadir 30 μ l de la solución de partículas sensibilizadas, componente A, se mezcla mediante agitación a 300 r.p.m. durante 2 minutos. La lectura del resultado se puede realizar transcurridas 12 horas. Si el suero contenía anticuerpos específicos de *Legionella pneumophila*, las partículas de látex aglutinan y una fina capa de partículas recubre la totalidad del fondo de los pocillos, véase la figura 1. Sin embargo, si en el suero hay ausencia de estos anticuerpos específicos, las partículas permanecen en suspensión y sedimentan de forma discreta apareciendo un botón en el centro del fondo del pocillo, véase figura 1. La titulación de un suero se puede observar en la figura 2. Los sueros con títulos mayores o iguales a 1/80 son considerados positivos.

Con el fin de demostrar la utilidad del reactivo objeto de esta patente se presenta un estudio en el que un conjunto de sueros, tanto positivos como negativos frente a anticuerpos de *Legionella pneumophila*, han sido evaluados con el reactivo de aglutinación-sedimentación de látex. Los resultados obtenidos han sido comparados con los obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA) que puede considerarse como referencia dentro de los test serológicos. De esta forma se han podido calcular parámetros que caracterizan el comportamiento inmunológico de este reactivo de látex, tales como la sensibilidad, especificidad y eficiencia.

Con el fin de determinar la especificidad del reactivo de aglutinación-sedimentación de látex se utilizó un panel de 269 sueros procedentes de donantes de sangre. Todos ellos fueron evaluados como negativos frente a anticuerpos de *Legionella pneumophila* mediante dos técnicas serológicas: Una de tipo inmunoenzimático (ELISA) y la otra IFI tanto para IgG como IgM. Cuatro de estos sueros dieron un título de 1/80 mediante aglutinación-sedimentación de látex mientras que el resto dieron negativos. Así pues, si se consideran como resultados de referencia serológicos los obtenidos mediante las técnicas anteriores, la especificidad del reactivo de aglutinación-sedimentación de látex para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma pneumoniae* es del 98,5%.

Para determinar la sensibilidad del reactivo de aglutinación-sedimentación de látex se empleó una colección de 39 sueros provenientes de enfermos hospitalizados en diferentes centros y diagnosticados de neumonía por *Legionella*. Los resultados obtenidos utilizando aglutinación-sedimentación de látex e IFI (para IgG e IgM) se muestran en la tabla 1. En las muestras positivas por IFI-IgG pero negativas para IFI-IgM, sólo una de ellas fue negativa por aglutinación-sedimentación de látex, mientras que el resto fueron positivas aunque con titulaciones bajas. Sin embargo, las tres muestras positivas en IFI-IgM pero negativas para IFI-IgG si fueron detectadas mediante la aglutinación-sedimentación de látex. Asumiendo como verdaderos los resultados de IFI, técnica que se considera de referencia para los test serológicos, la sensibilidad o del reactivo de aglutinación-sedimentación por látex es del 98%.

La eficiencia es un valor combinado de especificidad y sensibilidad que indica el porcentaje de pacientes correctamente clasificados. Asumiendo como verdaderos los resultados de IFI la eficiencia del reactivo de aglutinación-sedimentación de látex es del 97%.

El estudio que se muestra en la tabla 1 confirma que el reactivo de látex es capaz de detectar anticuerpos frente *Legionella pneumophila* de tipo IgG e IgM, aunque la sensibilidad del reactivo aumenta si se consideran los resultados de IFI-IgM lo que implica una detección preferente de IgM. La presencia en un suero de este tipo de anticuerpo es indicativa de una infección reciente, por lo que su detección es necesaria para asegurar el uso de una terapia antibiótica adecuada. Además, el test de aglutinación-sedimentación de látex presenta otra serie de ventajas frente a otros métodos convencionales. Es un test muy simple desde un punto de vista técnico que puede desarrollarse sin la necesidad de equipos de laboratorio complejos. Tampoco es necesario realizar una inactivación previa de los sueros. Por otro lado, el test de aglutinación-sedimentación de látex ofrece reactivos muy económicos y con una elevada estabilidad que les permite mantener su inmunoreactividad después de 12 meses de almacenamiento a 4°C.

ES 2 237 272 A1

TABLA 1

Resultados de test serológicos para detección de anticuerpos *L. Pneumophila*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Suero	Aglut.-Sedim. Látex	Immunofluorescencia (IFI)	
	Título	Título IgG	Título IgM
1	1280	Negativo<32	128
2	160	32	Negativo
3	80	Negativo<32	32+
4	80	32	32+
5	5120	64	256
6	5120	32	512
7	320	32	64+
8	160	32	32+
9	640	32	64+
10	5120	32	32
11	160	>128	Negativo
12	5120	>128	256
13	160	32	64+
14	320	64	64
15	320	128	256+
16	640	<32	Dudoso
17	1280	32	128
18	Negativo<80	32	Negativo
19	1280	256+	128
20	1280	256+	128
21	80	32+	Negativo
22	5120	512	256
23	1280	32	512
24	5120	64+	512
25	5120	32+	512
26	5120	32+	512
27	5120	64+	512
28	5120	32	256
29	5120	128+	256
30	160	256	128+
31	640	128+	128+
32	1280	256+	256+
33	1280	256+	256+
34	1280	128+	256+
35	1280	64+	256+
36	2560	256+	512+
37	640	32	64
38	320	Negativo<32	64
39	160	32	32

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico *Legionella pneumophila*, **caracterizado** porque esencialmente comprende la utilización de partículas de látex esféricas y monodispersas con un diámetro entre 0,7 y 1,2 μm , preferiblemente de 0,8 μm , y de un antígeno de *Legionella pneumophila* de naturaleza lipopolisacáridica (LPS).
2. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila* según reivindicación 1, **caracterizado** porque esencialmente comprende los siguientes pasos:
 - i) sensibilización de las partículas de látex con LPS de *Legionella pneumophila*, previamente obtenido de un extracto crudo de estos microorganismos, mediante el recubrimiento de las partículas con el antígeno LPS de *Legionella pneumophila* por un proceso de adsorción física,
 - ii) bloqueo de las partículas de látex, ya sensibilizadas, con albúmina de suero bovina (BSA) por un proceso de adsorción física en la superficie polimérica de las partículas de látex.
3. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipopolisacáridico de *Legionella pneumophila* según reivindicación 2, **caracterizado** porque la sensibilización de las partículas de látex con el antígeno LPS de *Legionella pneumophila* consta esencialmente de los siguientes pasos:
 - a) un volumen determinado de suspensión comercial de las partículas de látex se lava con tampón fosfato salino (PBS) y se resuspende en el mismo,
 - b) la suspensión de látex se mezcla con la suspensión de LPS y con tampón PBS, transcurriendo el proceso de adsorción con agitación a temperatura ambiente,
 - c) finalizada la adsorción, las partículas de látex sensibilizadas se lavan con tampón fosfato (PB).
4. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila* según reivindicación 3, **caracterizado** porque en el paso a) se realiza un lavado de un volumen determinado de suspensión comercial de las partículas de látex con 20 volúmenes de PBS y la resuspensión en este tampón se hace a una concentración del 5% de contenido sólido.
5. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno LPS de *Legionella pneumophila* según reivindicación 3, **caracterizado** porque en el paso b) la suspensión de látex se mezcla con la suspensión de antígeno LPS a razón de tres volúmenes de látex al 5% con 1 volumen de antígeno y todo ello con 20 volúmenes de PBS, transcurriendo el proceso de adsorción con agitación por un periodo entre 6 y 12 horas a temperatura ambiente.
6. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila* según reivindicación 3, **caracterizado** porque en el paso c) las partículas de látex sensibilizadas se lavan dos veces con 20 volúmenes de PB.
7. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila* según reivindicación 2, **caracterizado** porque el bloqueo de las partículas de látex, ya sensibilizadas, con albúmina de suero bovina (BSA) consta esencialmente de los siguientes pasos:
 - a) las partículas son redispersadas en una solución de ácido acético que contiene BSA,
 - b) las partículas sensibilizadas y bloqueadas se lavan con tampón glicina (GB) y se resuspenden en GB y NaN_3 .
8. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila* según reivindicación 7, **caracterizado** porque en el paso b) las partículas sensibilizadas y bloqueadas se lavan dos veces con 20 volúmenes de GB a pH 8 y se resuspenden al 0.065% en GB, pH 8 y 0.2 mg/ml de NaN_3 .
9. Uso de las partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila* mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la puesta en práctica de un procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente a *Legionella pneumophila* presentes en muestras serológicas.
10. Tampón de reacción **caracterizado** porque es una solución de los siguientes componentes: Glicina, NaCl u otra sal de cationes monovalentes, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), Albúmina de suero bovino (BSA) y NaN_3 .
11. Tampón de reacción según reivindicación 10, **caracterizado** porque dicha solución contiene sus componentes en las siguientes concentraciones: 0,1 M de Glicina, entre 300 y 450 mM (preferiblemente 350 mM) de NaCl, entre

ES 2 237 272 A1

0,1 y 0,15% de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), entre 0,7 y 1% de BSA (preferiblemente 1%), y 0,2 mg/ml de NaN_3 .

12. Tampón de reacción según reivindicaciones 10 ó 11, **caracterizado** porque tiene un pH de 8.

13. Uso del tampón de reacción según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, para la puesta en práctica de un procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Legionella pneumophila* presentes en muestras serológicas.

14. Procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Legionella pneumophila* presentes en muestras serológicas, **caracterizado** porque esencialmente comprende el uso de las partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila* mediante el procedimiento de reivindicaciones 1 a 8 y/o del tampón de reacción de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

15. Procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Legionella pneumophila* presentes en muestras serológicas según reivindicación 14, **caracterizado** porque se desarrolla mezclando la muestra de suero diluida en el tampón de reacción con las partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila*.

16. Procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Legionella pneumophila* presentes en muestras serológicas según reivindicaciones 14 ó 15, **caracterizado** porque la titulación del suero se realiza mezclando la muestra de suero diluida en el tampón de reacción con las partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila*, en pocillos de una placa de microtitulación.

17. Procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Legionella pneumophila* presentes en muestras serológicas según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, **caracterizado** porque consiste en un proceso de aglutinación-sedimentación de las partículas de látex sensibilizadas con LPS de *Legionella pneumophila*, en el que se produce la aglutinación específica de las partículas de látex sensibilizadas en presencia de anticuerpos específicos frente a *Legionella pneumophila* en el suero y la sedimentación de estas partículas de látex sensibilizadas en ausencia de dichos anticuerpos específicos en el suero.

18. Uso del procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Legionella pneumophila* presentes en muestras serológicas de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, para la puesta en práctica de un método de diagnóstico de enfermedades producidas por *Legionella pneumophila*.

Lectura	Interpretación
	Negativo
	No concluyente
	Positivo

Figura 1

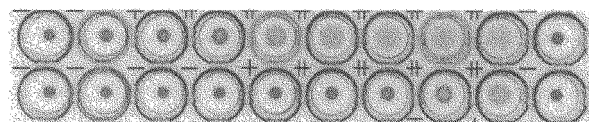


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 237 272

⑫ Nº de solicitud: 200300670

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.03.2003

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: G01N 33/569, 33/544

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ERUSLANOV, B.V.; BORZENKOV, V.N.; PECHERSKIKH, E.I.; et al. Designing the latex test system for express identification of Legionella in the external medium and clinical materials. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskih Nauk / Rossiiskaia Akademiia Meditsinskih Nauk. 1997, Nº 6, páginas 40-44. ISSN 0869-6047 (resumen) Medline (en línea) [recuperado el 02-06-2005] Recuperado de Epoque. Nº de acceso de Medline NLM9289279	1,9,14-18
A	HOLLIDAY, M.G. Use of latex agglutination technique for detecting Legionella pneumophila (serogroup 1) antibodies. Journal of Clinical Pathology. 1990, Vol. 43, Nº 10, páginas 860-862.	1-18
A	PEULA-GARCÍA, J.M.; MOLINA-BOLÍVAR, J.A.; VELASCO, J. et al. Interaction of bacterial endotoxine (lipopolysaccharide) with latex particles: application to latex agglutination immunoassays. Journal of Colloid and Interface Science. 2002, Vol. 245, páginas 230-236.	2,3,7, 9-12, 14-17
A	US 4321058 A (TOMIYAMA, T. & OGURA, T.) 23.03.1982, columna 2, línea 54 - columna 3, línea 19; columna 4, líneas 17-19; columna 5, líneas 9-30; columna 7, línea 55 - columna 8, línea 10.	2-8,10-12, 14-17
A	EP 0159025 A2 (TEIJIN LIMITED) 23.10.1985, página 15, línea 30 - página 16, línea 5; página 38.	2-8,10-12, 14-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.06.2005

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/1