



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 302 489**

② Número de solicitud: 200800628

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **04.03.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.07.2008**

⑦ Solicitante/s: **GUSERBIOT, S.L.**  
**Polígono Industrial Jundiz - Jundiz, 26**  
**01015 Vitoria, Álava, ES**

⑦ Inventor/es: **Barbero Mangas, Francisca;**  
**Izaguirre Goyoaga, Jon Kepa y**  
**Cruz Llosa, Armando**

⑦ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑤ Título: **Procedimiento para la detección de *Legionella* spp. mediante anticuerpo policlonal.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la detección de *Legionella* spp. mediante anticuerpo policlonal.

La presente invención proporciona un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp., un procedimiento para la obtención del antígeno, el uso de dicho antígeno como analito para la detección de *Legionella* spp. y un procedimiento para la detección de *Legionella* spp. en una muestra biológica basado en la utilización de un anticuerpo policlonal, que permite una detección a nivel de género.

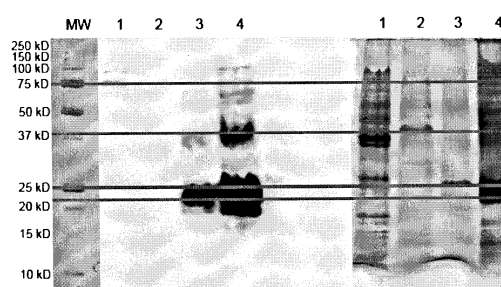


FIG. 4

ES 2 302 489 A1

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para la detección de *Legionella* spp. mediante anticuerpo policlonal.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en general en el campo del análisis de aguas, y en concreto en la detección de *Legionella*.

**10 Antecedentes de la invención**

*Legionella* es el agente etiológico de la enfermedad de los legionarios, una infección humana similar a la neumonía que se caracterizó por primera vez en 1976 y desde entonces es reconocida como un importante patógeno pulmonar responsable de gran número de infecciones nosocomiales.

15 Dentro de las *Legionellas* hay diversas especies, de las que la más importante es la *Legionella pneumophila* ya que es la que provoca la mayor parte de los casos de neumonía en humanos. No obstante, existen otras 30 especies de *Legionella* con potencial patógeno y dentro de ellas hay distintos serogrupos, que en el caso de *Legionella pneumophila* hay identificados más de 14 serogrupos.

20 La *L. pneumophila* es una bacteria gram negativa, que habitualmente se encuentra en ambientes acuáticos, sobre todo en aquellos ambientes que están cercanos a actividades humanas como son las torres de refrigeración, los sistemas de distribución de agua, y las aguas subterráneas.

25 En la actualidad se han desarrollado distintas técnicas para la detección de *Legionella* como son los cultivos bacterianos, sin embargo, estas bacterias necesitan unos requerimientos especiales para su crecimiento, de tal forma que su aislamiento en los medios microbiológicos comúnmente usados es de gran dificultad, por lo que la gran mayoría de los laboratorios no utilizan los cultivos o lo hacen inadecuadamente (Feeley JC. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 1979; 10:437-441).

30 Recientemente se están utilizando técnicas de detección molecular basadas en la PCR, concretamente en RT-PCR que detectan la *legionella* mediante la amplificación de distintas dianas genéticas (Nele Wellinghausen, *et al.* "Detection of legionellae in Hospital water samples by quantitative Real-Time Light Cycler PCR. Applied and Environmental Microbiology, VOL. 67, No. 9, sep. 2001, p3985-3993). Mediante estas técnicas los resultados se obtienen rápidamente en el laboratorio, sin embargo, la mayoría de las dianas utilizadas suelen estar quiescentes cuando el microorganismo se encuentra en su medioambiente, por lo que no son útiles para el diagnóstico de la *legionela* en muestras medioambientales.

**40 Descripción de la invención**

La presente invención proporciona un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp, un procedimiento para la obtención del antígeno y el uso de dicho antígeno como analito para la detección de *Legionella* spp. La presente invención proporciona un procedimiento para la detección de *Legionella* spp, basado en la utilización de un anticuerpo policlonal, que permite una detección a nivel de género, rápido (15-30 minutos) y de gran sensibilidad. El sistema permite la detección de *Legionella* spp tanto en suspensión como recuperada de un filtro de 0,45  $\mu$ m, tras filtrar la muestra en torre de filtración. De esta manera se puede llegar a una sensibilidad de  $10^7$  UFC/l, partiendo de muestras problema con una concentración mínima de  $10^4$  UFC/ml y un volumen de muestreo de 1000 ml. Por lo tanto es un dispositivo útil en la confirmación de la presencia de *Legionella* en cultivos crecidos o colonias en el procedimiento rutinario de control de este microorganismo en laboratorios de análisis.

50 Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp. donde dicho antígeno (antígeno de la presente invención comprende la proteína ribosomal S3 de la subunidad 30S, proteína ribosomal S4 de la subunidad 30S y el factor de elongación Tu.

55 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp. (antígeno de la presente invención, caracterizado porque dicho antígeno se obtiene mediante lisis celular de un cultivo de *Legionella pneumophila*.

60 En un aspecto más particular de la presente invención, la lisis celular se realiza con detergentes, enzimas líticas, antibióticos, calor y/o sonicación.

En un aspecto más particular, los detergentes utilizados en la presente invención son seleccionados de entre SDS, tween, Tritón X-100, desoxicolato sódico y/o nonidet.

65 En un aspecto más particular, los enzimas líticos utilizados en la presente invención son seleccionados de entre lisozima, proteinasa k y/o mutanolisina.

En un aspecto más particular los antibióticos utilizados en la presente invención son seleccionados de entre la polimixina, colistina y/o surfactina.

5 En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de un antígeno obtenido por el procedimiento descrito en la presente invención como analito para la detección de *Legionella* spp.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

10

a) tratamiento previo de la muestra biológica

b) contactar la muestra biológica tratada en a) con un anticuerpo anti-*Legionella*

15

c) detectar el compuesto antígeno-anticuerpo

En un aspecto más particular de la presente invención, el anticuerpo policlonal anti-*Legionella* reacciona con los antígenos proteína ribosomal S3 de la subunidad 30S, proteína ribosomal S4 de la subunidad 30S y el factor de elongación Tu.

20

En un aspecto más particular de la presente invención, el anticuerpo anti-*Legionella* se encuentra conjugado a partículas de oro coloidal.

En un aspecto más particular de la presente invención, el anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde el anticuerpo anti-*Legionella* se encuentra inmovilizado actuando como anticuerpo de captura en un sistema inmunoquímico.

25

En un aspecto más particular de la presente invención, la etapa a) de tratamiento previo de la muestra biológica consiste en una lisis celular.

30

En un aspecto más particular de la presente invención, la lisis celular de la etapa a) se realiza con detergentes, enzimas líticas, antibióticos, calor y/o sonicación.

En un aspecto más particular, los detergentes utilizados en la presente invención son seleccionados de entre SDS, tween, Tritón X-100, desoxicolato sódico, y/o nonidet.

35

En un aspecto más particular, los enzimas líticos utilizados en la presente invención son seleccionados de entre lisozima, proteinasa k, y/o mutanolisina.

En un aspecto más particular, los antibióticos utilizados en la presente invención son seleccionados de entre polimixina, colistina, y/o surfactina.

40

En un aspecto más particular, la muestra biológica de la presente invención es una muestra de agua.

45

En un aspecto más en particular, la muestra biológica de la presente invención está en suspensión líquida.

En un aspecto más en particular, la muestra biológica de la presente invención está en filtro.

### Descripción de las figuras

50

La figura 1 muestra la titulación de suero policlonal frente a células intactas.

La figura 2 muestra la titulación de suero policlonal frente a células lisadas.

55

La figura 3 se refiere a la titulación de suero policlonal frente a las células lisadas. Reactividad cruzada.

La figura 4 muestra la caracterización del anticuerpo obtenido por western blotting. MW: marcadores de peso molecular, A: Western Bot con suero  $\alpha$ -*Legionella*; 1: Extracto crudo de *Escherichia coli*, 2: Extracto crudo de *Campylobacter coli*, 3: Extracto de *Legionella pneumophila* tratado con TCA-acetona, 4: Extracto crudo de *Legionella pneumophila*, B: Gel de poliacrilamida al 12.5%. 1: Extracto crudo de *Escherichia coli*, 2: Extracto crudo de *Campylobacter coli*, 3: Extracto de *Legionella pneumophila* tratado con TCA-acetona, 4: Extracto crudo de *Legionella pneumophila*.

60

La figura 5 muestra el ensayo límite de detección ( $10^7$  UFC/l)

### 65 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp, un procedimiento para la obtención del antígeno y el uso de dicho antígeno como analito para la detección de *Legionella* spp. La presente

## ES 2 302 489 A1

invención proporciona un procedimiento para la detección de *Legionella* spp mediante la utilización de un anticuerpo policlonal en muestras de agua mediante un sistema inmunocromatográfico y/o ELISA.

Los presentes ejemplos pretenden ser ilustrativos de la invención y nunca limitativos

5

### Ejemplo 1

#### *Preparación del antígeno*

10 El origen del antígeno fue un cultivo de 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en agar BCYE a partir de una estría de *Legionella pneumophila* ATCC 33152. Pasado este periodo, se resuspendió cada placa en 1 ml de caldo Ringer hasta conseguir una suspensión del orden de 10<sup>9</sup> UFC/ml. La suspensión se lavó tres veces con caldo ringer mediante centrifugación a 14000 g y recuperación del pellet celular con el fin de eliminar componentes propios del medio de cultivo.

15

El antígeno se consiguió por lisado celular por detergente (dodecil sulfato sódico-SDS). Para ello, el pellet celular procedente de 1 ml de suspensión y lavado se resuspendió en 1 ml de una solución de SDS al 1% y se dejó actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo de tiempo se filtró por un filtro de 0,22 µm de poro para eliminar las células no lisadas.

20

La suspensión filtrante se caracterizó en cuanto a concentración de proteína mediante el método EZQ (Molecular Probes) y mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de tinción con Sypro Ruby.

### 25 Ejemplo 2

#### *Obtención del anticuerpo*

30 Para la obtención del anticuerpo en primer lugar se procedió a la inmunización del conejo, para ello se administraron distintas dosis a conejos (*Orthychotlagus cuniculus*) hembra de raza New Zealand White de 2,5 kg con la pauta descrita en la tabla 1.

TABLA 1

*Pauta de inmunización de los conejos*

35

|                             | Día | Cantidad de proteína inmunizada (mg) |
|-----------------------------|-----|--------------------------------------|
| Sangrado preinmune          | 0   | –                                    |
| 1 <sup>a</sup> inmunización | 0   | 0,8                                  |
| 2 <sup>a</sup> inmunización | 14  | 0,5                                  |
| 1 <sup>er</sup> sangrado    | 24  | –                                    |
| 3 <sup>a</sup> inmunización | 44  | 0,5                                  |
| 2 <sup>o</sup> sangrado     | 54  | –                                    |
| 4 <sup>a</sup> inmunización | 74  | 0,5                                  |
| Exanguinación final         | 84  | –                                    |

55

#### Día 0: Sangrado preinmune

Extracción de 5-7 ml de sangre de la arteria auricular. No se aplica anestesia.

60

#### Día 0: 1<sup>a</sup> inmunización subcutánea

0,8 mg de proteína + adyuvante completo de Freund

65

No se aplica anestesia.

## ES 2 302 489 A1

### Día 14: 2ª inmunización subcutánea

0,5 mg de proteína + adyuvante incompleto de Freund

5 No es necesaria anestesia.

### Día 24: 1er sangrado.

10 Extracción de 5-7 ml de sangre de la arteria auricular.

No es necesaria anestesia.

### Día 35: 3ª inmunización subcutánea

15 0,5 mg de proteína + adyuvante incompleto de Freund

No es necesaria anestesia.

20

### Día 45: 2º sangrado

Extracción de 5-7 ml de sangre de la arteria auricular.

25 No es necesaria anestesia.

### Día 56: 4ª inmunización subcutánea

30 0,5 mg de proteína + adyuvante incompleto de Freund

No es necesaria anestesia.

### Día 66: Exanguinación final

35 Exanguinación cardíaca. Se obtuvieron aproximadamente 150 ml de sangre. Se aplicó una preanestesia con Dormicum (Midazolam) intramuscular en el glúteo. Una vez el animal estuvo relajado se anestesió con Imalgéne 1000 (ketamina) i.m. en el glúteo.

40 Una vez obtenida la sangre, el suero se obtuvo por coagulación. Las inmunoglobulinas se purificaron mediante resina de proteína A. La purificación se realizó a media escala (10 ml) utilizando el kit Montage Prosep (Millipore) o a pequeña escala 1 ml en columna de Proteína A utilizando el sistema cinematográfico AKTA Explorer (GE healthcare).

45 El anticuerpo quedó eluido en tampón citrato 0,3 M pH 3 neutralizado con tris 1 M. Se realizó un cambio de tampón mediante ultrafiltración con un dispositivo de membrana tangencial de tamaño de poro de 60 kDa (Millipore).

### Ejemplo 3

#### *Caracterización del anticuerpo*

50 Tanto el suero como el anticuerpo purificado se caracterizaron por ELISA directo. La caracterización del antisuero producido para el desarrollo se muestra en las figuras 1 y 2.

55 Los títulos (máxima dilución del suero a la cual presenta señal diferencial respecto al suero preinmune) de la producción se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

*Títulos*

60

| Antígeno                 | 1ª Extracción | 2ª Extracción |
|--------------------------|---------------|---------------|
| <i>Legionella</i> entera | 256           | 16000         |
| <i>Legionella</i> lisada | 4000          | 256000        |

65

## ES 2 302 489 A1

El anticuerpo se caracterizó mediante una titulación ELISA para evaluar la máxima reactividad frente a extractos de diferentes microorganismos preparados de manera similar. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Las cepas ensayadas fueron las siguientes:

*Legionella pneumophila* ATCC 33152, *Legionella anisa* ATCC 35292, *Bacillus subtilis* CECT 498, *Escherichia coli* CECT 10536, *Staphylococcus aureus* CECT 828, *Listeria monocytogenes* CECT 911.

Los títulos relativos de cada una de las especies ensayadas se muestran en la tabla 3:

TABLA 3

| Especie                                  | Título |
|--|--------|
| <i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33152 | 8000   |
| <i>Legionella anisa</i> ATCC 35292       | 1000   |
| <i>Bacillus subtilis</i> CECT 498        | 128    |
| <i>Escherichia coli</i> CECT 10536       | 500    |
| <i>Staphylococcus aureus</i> CECT 828    | 16     |
| <i>Salmonella typhimurium</i> CECT 443   | 128    |
| <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 911   | <1     |

Se observó como las reactividades mayores se presentaron en las especies de *Legionella* ensayadas por lo que comprobó que existe una dilución 1:1000 suero 1  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo a la cual el anticuerpo fue específico del género *Legionella*, representado por las especies ensayadas.

Para la evaluación tanto de la reactividad cruzada como del número de componentes proteicos que actuaron de antígenos en la detección, se realizó un análisis por western blotting del anticuerpo obtenido (figura 4), verificando la no reactividad cruzada del anticuerpo frente a *Escherichia coli* y *Campylobacter coli*. Observando tres componentes reactivos principales.

Para la identificación de los antígenos reactivos, se picaron las bandas proteicas del gel de electroforesis compatibles con la reactividad en western blotting. Los componentes identificados por MALDI-TOF se muestran en la tabla 4:

TABLA 4

| Peso molecular (Da) | Identificación           | Especie                       |
|---------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 24159               | 30S ribosomal protein S3 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 23474               | 30S ribosomal protein S4 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 43344               | Elongation factor Tu     | <i>Legionella pneumophila</i> |

### Ejemplo 4

#### Detección de *Legionella* mediante dispositivo inmunocromatográfico

La muestra analizable fue una suspensión de células a partir de una colonia crecida en-placa o un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  utilizado en la filtración de 1000 ml de agua. A la muestra se le aplicó un tratamiento de lisis consistente en alguno de los siguientes procedimientos

- Calentamiento a 100°C 10 minutos
- Tratamiento con polimixina 5,3 mg/ml + NaCl 9 g/l + calentamiento a 100°C 10 minutos.

## ES 2 302 489 A1

El dispositivo desarrollado se fabricó mediante el siguiente protocolo:

### A) Aplicación de los anticuerpos a la membrana

- 5 - Corte del rollo en tiras de 20 cm procurando que el corte sea a escuadra. Se utilizaron membranas HiFlow (Millipore SHF2400225)
- Dilución de los anticuerpos en Tampón fosfato 10 mM, pH 7,4 en la siguiente proporción:
  - 10 - Línea de control: Polyclonal Goat anti-Rabbit (Dakocytomation Z0421) dilución directa. Para 500 tiras fue necesario un volumen de 500  $\mu$ l. procedente de un volumen de 125  $\mu$ l de anticuerpo. El volumen para cada tira de 30 cm fue de 30  $\mu$ l (60 tiras).
  - 15 - Línea de captura: Polyclonal anti *Legionella* spp. (desarrollo propio). Fue necesario un volumen de 500  $\mu$ l en lotes de 30  $\mu$ l. Dilución de trabajo 1:1.
- Aplicación de una línea de control y una línea de captura de anticuerpos sobre la membrana a la concentración necesaria con el Biodot (Tasa volumen/cm: 1  $\mu$ l/cm).
- 20 - Secado de las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Colocado de la membrana durante 30 minutos en una solución Triton X 100 al 0,5%.
- Aclarado de la membrana en agua destilada y secado durante 30 minutos a 30°C.

25

### B) Conjugación del anticuerpo al oro y preparación del pad del conjugado.

- 30 - Preparación de un tubo con 15 ml del volumen de oro coloidal (pH 9) (Colloidal Gold 40 nm. Schleicher & Schuell Ref. 10534251) deseado (150  $\mu$ l/tira) y adición 1,5 ml de la dilución del anticuerpo de desarrollo propio gota a gota según la proporción calculada según titulación. Dilución del anticuerpo en Na-Borato 2 mM pH 9.
- Agitación durante 10 minutos.
- 35 - Adición de BSA de una solución stock al 10% hasta una concentración final del 1%.
- agitación suavemente durante otros 10 minutos.
- 40 - Centrifugación del conjugado a 16000 x g durante 45 minutos a 4°C.
- Resuspensión del pellet en TBS con BSA 1% concentrando 5 veces el volumen original.
- Recorte de la membrana de conjugado (Millipore Glass Fiber Conjugate, 10 x 300 mm GFSP103000) en porciones de 30 cm.
- 45 - Aplicación de 25  $\mu$ l de la mezcla a cada tira depositada sobre una superficie de vidrio cada 0,5 cm. O realizar aplicación automática con estos parámetros.
- 50 - Secado a 40°C durante 2 horas.

### C) Montaje de las membranas

- 55 Como almohadilla absorbente se utilizó la almohadilla comercial Absorbent Pad 17 x 300 mm CFSP173000 y como almohadilla de la muestra se utilizó la almohadilla comercial Sample Pad 17x 300 mm CFSP173000). Las tiras se montaron según especificaciones por el siguiente orden:
- 60 - Despegar el protector adhesivo de la parte superior de la membrana.
  - Pegar la tira absorbente, cuidando de que se solape con la capa de nitrocelulosa
  - Despegar el protector de la parte correspondiente al conjugado y el absorbente.
  - 65 - Pegar la tira del conjugado (previamente secada).
  - Pegar la tira del absorbente.

## ES 2 302 489 A1

- Colocar el laminado
- Cortar el conjunto en unidades de 0,5 cm.

### 5 Ejemplo 5

#### *Ensayo de detección en muestras reales*

10 Se analizaron un total de 15 muestras a las cuales se aplicó el tratamiento de lisis y se inocularon a tres niveles de contaminación. No se observó inhibición de la reacción inmunoquímica en ninguna de las muestras por lo que se dedujo que al menos en las muestras analizadas no existía ningún inhibidor que impidiera el ensayo. Los resultados se muestran en la tabla 5

TABLA 5

*X 100 Filtrado y concentrado*

L: Lisada, SL; Sin Lisar. ND: No Determinado

| MUESTRA | X100 | 0 UFC/L |    | 100 UFC/L |    | 1000 UFC/L |    | 10 <sup>6</sup> UFC/L |    |
|---------|------|---------|----|-----------|----|------------|----|-----------------------|----|
|         |      | L       | SL | L         | SL | L          | SL | L                     | SL |
| 162-228 | -    | +-      | +- | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 162-229 | -    | +-      | +  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 162-227 | -    | +-      | +- | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 162-273 | -    | +-      | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 199-52  | -    | -       | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 199-53  | -    | -       | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 199-54  | -    | -       | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 89      | ND   | -       | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 192-1   | ND   | -       | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 192-2   | ND   | -       | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 199     | ND   | -       | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| 251     | ND   | -       | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |
| UV-M    | ND   | -       | -  | -         | -  | -          | -  | -                     | -  |

La calibración del lote de tiras utilizado resultó de la siguiente manera. Según este ensayo el límite de detección se asegura a 10<sup>7</sup> UFC/ml (figura 5).

Debido a la baja sensibilidad del dispositivo se aplicaron diferentes procedimientos de lisis simples o combinados a diferentes diluciones de *Legionella*. Las suspensiones se filtraron por 0,22 μm para descartar la fracción no lisada y se inmovilizaron en una placa de poliestireno. El ensayo consistió en una dilución seriada del suero correspondiente al anticuerpo de diseño propio según el ejemplo 2, la evaluación comparativa de cada antígeno respecto a un suero control. El resultado de estos ensayos fue la determinación de la dilución del suero mínima (título) a la que se detectó una concentración determinada de *Legionella*. Por lo tanto, cuanto mayor fue este valor mayor fue la reactividad del suero frente a un antígeno porque se mantuvo la reactividad a una dilución alta. Se realizaron diluciones de 40 a 20000 seriadas al 50%. Por ello, el título para cada concentración y procedimiento de lisis osciló entre >20000 (máxima reactividad) y < 40 (nula o muy baja reactividad). Se consideró para el cálculo del título aquella dilución en la que el suero problema fuera mayor que el control en al menos un 50% en unidades de absorbancia.

Los tratamientos aplicados fueron:

- Tratamiento A: SDS 1%. Tratamiento durante 10 minutos. Compatible con un dispositivo de campo.
- Tratamiento B: Tween 20 1%. Tratamiento durante 10 minutos. Compatible con un dispositivo de campo.
- Tratamiento C: Lisis con Lisozima. Tratamiento de 30 minutos a 37°C. Compatible con un dispositivo de campo.

## ES 2 302 489 A1

- Tratamiento D: Lisis con Proteinasa K Tratamiento de 30 minutos a 60°C. Compatible con un procedimiento de laboratorio.
- Tratamiento E: Calentamiento a 95°C 10 minutos. Compatible con un procedimiento de laboratorio.
- Tratamiento F: Sonicación en baño de ultrasonidos 30 minutos a máxima potencia. Compatible con un procedimiento de laboratorio.

Adicionalmente se han probado los siguientes tratamientos combinados.

|     |     |     |       |       |     |
|-----|-----|-----|-------|-------|-----|
| A+E | A+F | C+A | C+A+E | C+A+F |     |
| B+E | B+F | C+B | C+B+E | C+B+F |     |
| C+E | C+F | D+A | D+A+E | D+A+F |     |
| D+E | D+F | D+B | D+B+E | D+B+F | F+E |

Los resultados se muestran en la tabla 6

TABLA 6

*Título del anticuerpo frente a diluciones (UFC/ml) tratadas del antígeno*

|       | 10 <sup>7</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10   |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| A     | >20000          | >20000          | 10000           | 10000           | <40             | <40             | <40  |
| A+E   | >20000          | >20000          | >20000          | 10000           | 640             | 640             | 640  |
| A+F   | >20000          | >20000          | >20000          | 5000            | 40              | 40              | <40  |
| B     | <40             | <40             | <40             | <40             | <40             | <40             | <40  |
| B+E   | >20000          | >20000          | 40              | 40              | 40              | 40              | 40   |
| B+F   | 640             | 320             | 320             | 160             | 160             | 160             | 80   |
| C     | >20000          | >20000          | >20000          | 2560            | 2560            | 2560            | 40   |
| C+A   | 5000            | 5000            | 5000            | 2560            | 2560            | <40             | <40  |
| C+A+E | >20000          | 10000           | 10000           | 10000           | 2560            | 640             | 320  |
| C+A+F | >20000          | >20000          | >20000          | >20000          | 10000           | 40              | 40   |
| C+B   | 5000            | >20000          | >20000          | >20000          | <40             | <40             | <40  |
| C+B+E | >20000          | >20000          | 2560            | >20000          | >20000          | 160             | 160  |
| C+B+F | >20000          | >20000          | >20000          | >20000          | >20000          | <40             | <40  |
| C+E   | 2560            | 2560            | 2560            | 1280            | 640             | 640             | 640  |
| C+F   | >20000          | >20000          | >20000          | >20000          | 10000           | <40             | <40  |
| D     | >20000          | >20000          | <40             | <40             | <40             | <40             | <40  |
| D+A   | >20000          | >20000          | 40              | 40              | 40              | 40              | 40   |
| D+A+E | >20000          | >20000          | 40              | <40             | <40             | <40             | <40  |
| D+A+F | >20000          | >20000          | 40              | <40             | <40             | <40             | <40  |
| D+B   | >20000          | 5000            | <40             | <40             | <40             | <40             | <40  |
| D+B+E | >20000          | 640             | 640             | <40             | <40             | <40             | <40  |
| D+B+F | >20000          | 80              | 80              | <40             | <40             | <40             | <40  |
| D+E   | >20000          | >20000          | >20000          | 640             | 320             | 320             | 320  |
| D+F   | >20000          | >20000          | 1280            | 1280            | 1280            | 1280            | <40  |
| E     | >20000          | >20000          | >20000          | >20000          | 5000            | 2560            | 1280 |
| F     | >20000          | >20000          | 2560            | 640             | 640             | 640             | 640  |
| E+F   | >20000          | >20000          | >20000          | 2560            | 2560            | 2560            | 2560 |

## ES 2 302 489 A1

De este ensayo se puede concluir:

- Las tres concentraciones mayores ensayadas (107 UFC/ml, 106 UFC/ml y 105 UFC/ml) se pueden detectar con la mayoría de los tratamientos aplicados.

5

- Las tres concentraciones bajas ensayadas (104 UFC/ml, 103 UFC/ml y 102 UFC/ml) se pueden detectar con mayor facilidad en tratamientos combinados Lisozima-Tween y calentamiento.

10

- La concentración más baja (10 UFC/ml) se puede detectar con mayor facilidad con tratamientos físicos (calentamiento y sonicación y por el tratamiento combinado SDS-calentamiento.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp. **caracterizado** porque dicho antígeno comprende la proteína ribosomal S3 de la subunidad 30S, proteína ribosomal S4 de la subunidad 30S y el factor de elongación Tu.
2. Procedimiento para la obtención de un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp. según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho antígeno se obtiene mediante lisis celular de un cultivo de *Legionella pneumophila*.
- 10 3. Procedimiento para la obtención de un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp. según la reivindicación 2, donde la lisis celular se realiza con detergentes, enzimas líticas, antibióticos, calor y/o sonicación.
- 15 4. Procedimiento para la obtención de un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp. según la reivindicación 3, donde los detergentes son seleccionados de entre SDS, tween, Tritón X-100, desoxicolato sódico y/o nonidet.
- 20 5. Procedimiento para la obtención de un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp. según la reivindicación 3, donde los enzimas líticas son seleccionados de entre lisozima, proteinasa k y/o mutanolisina.
6. Procedimiento para la obtención de un antígeno que se une a un anticuerpo anti-*Legionella* spp. según la reivindicación 2, donde los antibióticos son seleccionados de entre la polimixina, colistina y/o surfactina.
- 25 7. Uso de un antígeno obtenido por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2-6 como analito para la detección de *Legionella* spp.
8. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- 30 d) tratamiento previo de la muestra biológica
- e) contactar la muestra biológica tratada en a) con un anticuerpo anti-*Legionella*
- f) detectar el compuesto antígeno-anticuerpo.
- 35 9. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según la reivindicación 8, donde el anticuerpo policlonal anti-*Legionella* reacciona con los antígenos proteína ribosomal S3 de la subunidad 30S, proteína ribosomal S4 de la subunidad 30S y el factor de elongación Tu.
- 40 10. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, donde el anticuerpo anti-*Legionella* se encuentra conjugado a partículas de oro coloidal.
- 45 11. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde el anticuerpo anti-*Legionella* se encuentra inmovilizado actuando como anticuerpo de captura en un sistema inmunoquímico.
- 50 12. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde la etapa a) de tratamiento previo de la muestra biológica consiste en una lisis celular.
- 55 13. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según la reivindicación 12, donde la lisis celular se realiza con detergentes, enzimas líticas, antibióticos, calor y/o sonicación.
- 60 14. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según la reivindicación 13, donde los detergentes son seleccionados de entre SDS, tween, Tritón X-100, desoxicolato sódico, y/o nonidet.
- 65 15. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según la reivindicación 13, donde los enzimas líticas son seleccionados de entre lisozima, proteinasa k, y/o mutanolisina.
16. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según la reivindicación 13, donde los antibióticos son seleccionados de entre polimixina, colistina, y/o surfactina.

## ES 2 302 489 A1

17. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según cualquiera de las reivindicaciones 8-16, donde la muestra biológica es una muestra de agua.

5 18. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según la reivindicación 17, donde la muestra biológica está en suspensión líquida.

19. Procedimiento para la detección de *Legionella* spp en una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-*Legionella* según la reivindicación 17, donde la muestra está en filtro.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

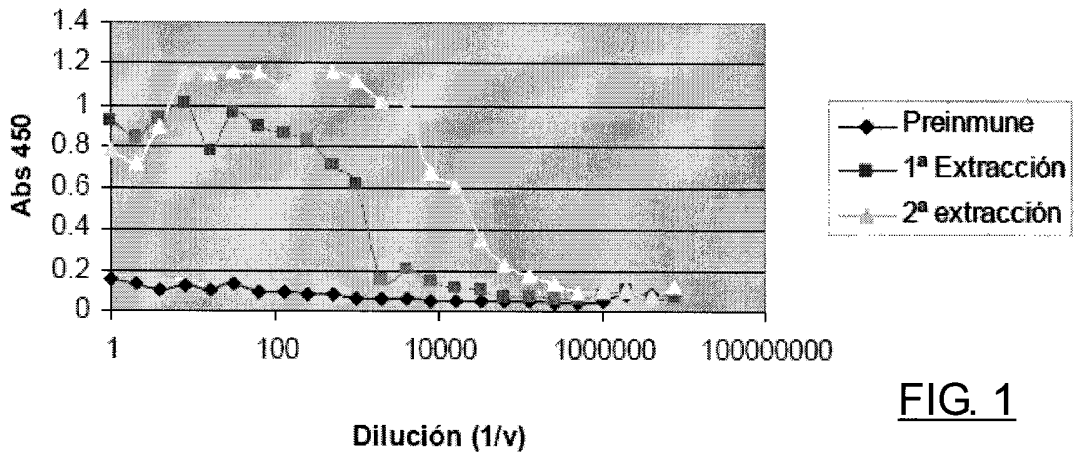


FIG. 1

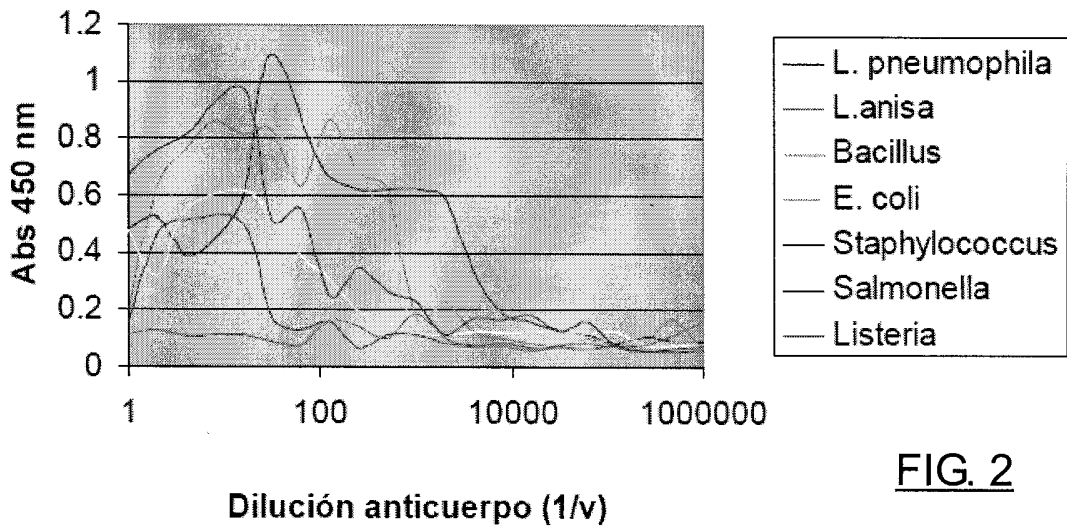


FIG. 2

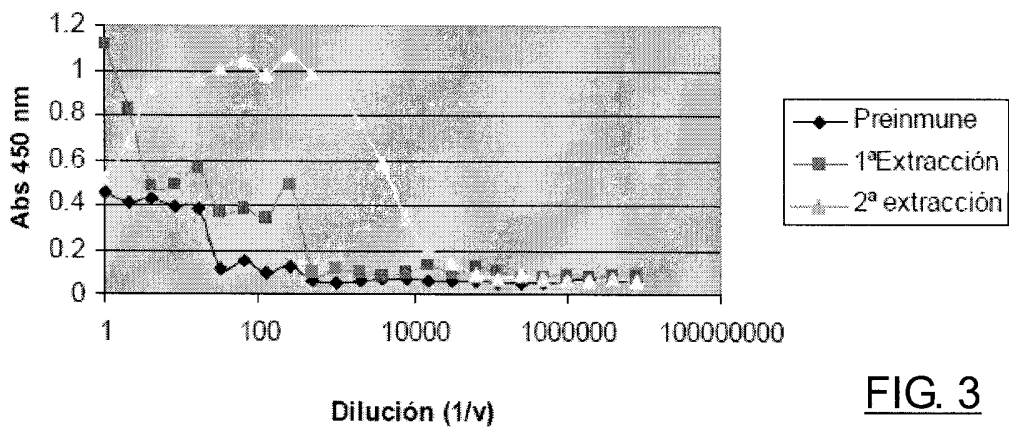


FIG. 3

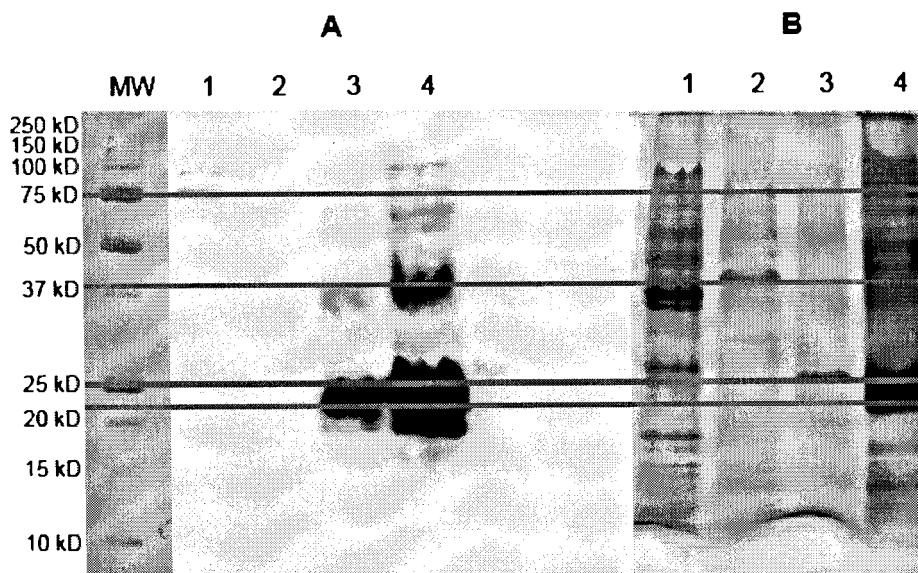


FIG. 4

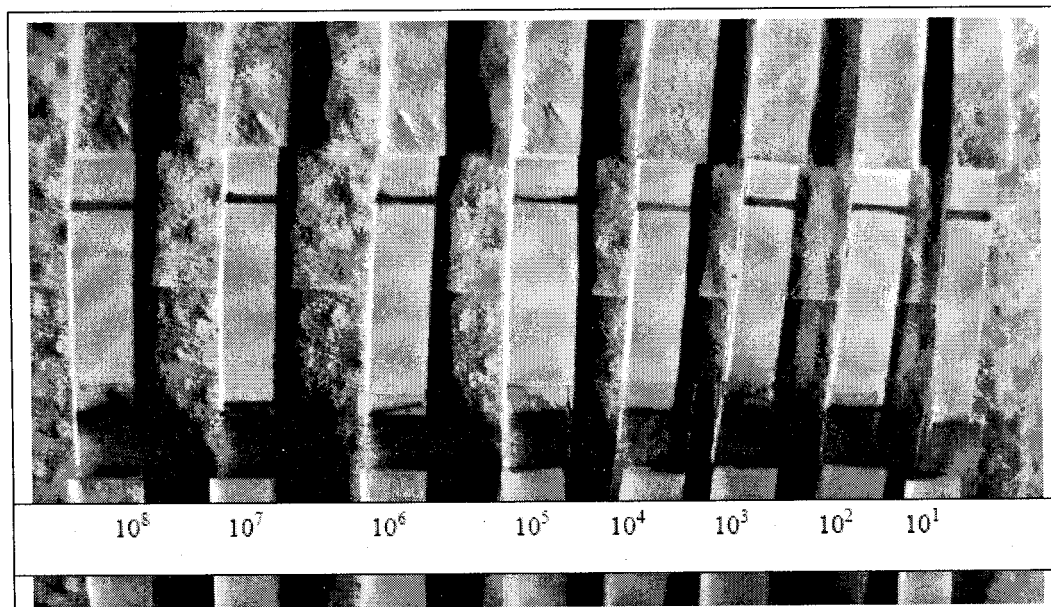


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 302 489

② Nº de solicitud: 200800628

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.03.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 39/02** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X         | EP 1804061 A1 (ABAG & UNIV CLAUDE BERNARD LYON) 04.07.2007, reivindicaciones.   | 1-19                       |
| X         | FR 2878861 A1 (ABAG & UNIV CLAUDE BERNARD LYON) 09.06.2006  | 1-8                        |
| X         | EP 0364971 A2 (UNILEVER NV) 25.04.1990  | 1-19                       |
| X         | JP 2004201605 A (ASAHI CHEMICAL CORP) 22.07.2004, BASE DE DATOS EPODOC en EPOQUE, Recuperado de EPOQUE [en línea], [recuperado el 26.05.2008], (resumen).   | 1,7,8                      |
| A         | BARTHE C. et al. Common epitope on the lipopolysaccharide of Legionella pneumophila recognized by a monoclonal antibody". Journal of clinical microbiology. May 1988. Vol. 26, Nº 5, páginas 1016-1023. ISSN 0095-1137 (Print). | 1-19                       |

**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:

|   |                                      |                      |
|---|--------------------------------------|----------------------|
| <b>Fecha de realización del informe</b><br>26.05.2008 | <b>Examinador</b><br>J. Manso Tomico | <b>Página</b><br>1/1 |
|---|--------------------------------------|----------------------|