



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 676**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00993415 .9**

86 Fecha de presentación : **12.12.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1238056**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.09.2002**

54

Título: **Bacteria *Rickettsia pulicis*, método de diagnóstico serológico.**

30

Prioridad: **14.12.1999 FR 99 15777**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73

Titular/es:
**Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II
Jardin du Pharo, 58 bd Charles Livon
13284 Marseille Cédex 07, FR**

72

Inventor/es: **Raoult, Didier y
La Scola, Bernard**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 296 676 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

Bacteria *Rickettsia pulicis*, método de diagnóstico serológico.

5 La presente invención se refiere al campo microbiológico, en particular al campo del diagnóstico microbiológico. Más precisamente, la invención se refiere a un método que se refiere al aislamiento de una nueva bacteria denominada provisionalmente "*Rickettsia pulicis*", así como al uso de la cepa para la realización de un ensayo serológico.

10 En efecto, la invención se refiere a un método para el diagnóstico serológico *in vitro* de las infecciones con "*Rickettsia pulicis*" así como a un dispositivo para la realización de este método. La invención se refiere asimismo a un kit para la detección *in vitro* de la bacteria.

15 Una bacteria había sido detectada pero no aislada en unas pulgas en los Estados Unidos mediante unas reacciones indirectas de la coloración mediante el método de Gimenez que colorea las Rickettsias, mediante unos anticuerpos dirigidos contra las Rickettsias y mediante la determinación de secuencias de genes específicos de Rickettsia para esta bacteria. Se había denominado en esta época agente ELB [Adams JR., Am. J. Trop. Med Hyg., 1990; 43:400-409]. Se han podido ampliar unos genes comunes al conjunto de las Rickettsias en esta bacteria, y se ha podido secuenciar y demostrar que esta bacteria era original. Esta bacteria se considera como uno de los elementos que explican la frecuencia muy alta de Rickettsiosis de pulgas en California [Schriefer ME., J. Med. Entomol., 1994; 31:681-5].
20 Se ha descrito una observación [Schriefer ME., J. Clin. Microbiol., 1994; 32 :949-54] de una infección en el ser humano relacionada con esta bacteria. Esta bacteria ha constituido el objeto de numerosas tentativas de cultivo hasta ahora sin éxito. Las tentativas de cultivo se han realizado sobre animales (ratones) y después sobre cultivos celulares (células VERO y célula L229) [Higgins JA., J. Clin. Microbiol., 1996; 34 :671-4; Radulovic S., Infect. Immun., 1995; 63:4826-9; Radulovic S., Antimicrobial. Agent. Chemother., 1995; 39:2564-6]. Estas tres publicaciones han descrito el cultivo de la bacteria en cuestión que fue denominada *Rickettsia felis*. Sin embargo, estas publicaciones no han sido confirmadas y no está disponible ninguna cepa en los laboratorios que han pretendido haber aislado esta bacteria. Los ensayos realizados por estos laboratorios han comprendido unas muestras desprovistas de cualquier Rickettsia o bien unas muestras contaminadas con otra Rickettsia, *Rickettsia Typhi*. Los análisis mediante SDS PAGE revelan que la cepa así aislada por estos autores que se ha denominado *R. felis* era realmente *R. Typhi*, y en cualquier caso no correspondía al agente ELB. Es debido a esto que la bacteria según la presente invención, que es en realidad el primer
25 aislado del agente ELB, ha sido denominada provisionalmente "*Rickettsia pulicis*".

30 Por lo tanto, no existía antes de la presente invención ninguna posibilidad de realizar una reacción serológica, y por otra parte, no estaba disponible ningún aislado de esta bacteria en ninguna colección ni en ningún laboratorio. Sin embargo, numerosas pulgas están infectadas naturalmente y existen unas colecciones de pulgas que están infectadas al 100% debido a la transmisión sistemática de esta bacteria de la hembra a sus descendientes.

Los inventores han implementado un método específico y original para el cultivo de la bacteria "*Rickettsia pulicis*".

40 Las bacterias del género *Rickettsia* se cultivan habitualmente a 37°C para las bacterias del grupo typhus y a 32°C para las bacterias del grupo maculosas [Weiss E. Annu. Rev. Microbiol. 1982; 36; 345-70].

Las tentativas de cultivo sobre células de mamíferos VERO L929, HEL y MRC5 o de pájaros, a 37°C y a 32°C se han mostrado ineficaces.

45 Los inventores han descubierto de manera sorprendente que el cultivo de las células hospedantes se debe realizar a una temperatura inferior a 30°C, preferentemente entre 25 y 30°C, más preferentemente a 28°C.

50 Los inventores han realizado la inoculación de triturado de pulgas sobre unas células de *Xenopus laevis* de la línea XTC-2 cultivadas a 28°C. La bacteria se obtiene después de 14 a 28 días de cultivo; 19/20 de las pulgas que eran positivas mediante detección genómica (PCR) han sido cultivadas con éxito mediante este método, que tiene por lo tanto un ratio de éxito del 95%. Se ha establecido la bacteria de referencia aislada (URRWFXCal2), y actualmente se han obtenido 10 pasos. La bacteria aislada presenta las características genéticas descritas para el agente ELB en cuanto a los genes de la citratosintasa y del ARN 16S (acceso en Gen Bank U33922 y L28944 respectivamente).
55

La presente invención se refiere por lo tanto a esta bacteria *Rickettsia pulicis* que corresponde al agente ELB así aislada que se establece en cultivo.

60 Mediante la expresión "establecida en cultivo" se entiende que la bacteria se obtiene de manera reproducible y se multiplica a lo largo del tiempo mediante replantes sucesivos sobre cultivos de células.

Más particularmente, la presente invención tiene por objeto una bacteria *Rickettsia pulicis* aislada y establecida en cultivo sobre un cultivo celular a la temperatura de 25 a 30°C, preferentemente 28°C.

65 Todavía más particularmente, la bacteria *Rickettsia pulicis* según la invención se cultiva sobre células de *Xenopus laevis*, línea XTC-2.

ES 2 296 676 T3

En un modo de realización, el método de aislamiento según la invención comprende las siguientes etapas:

- 1) realizar un cultivo de células, preferentemente de células de *Xenopus laevis* de línea XTC-2, a la temperatura de cultivo de 25 a 39°C, preferentemente de 28°C, y
- 2) inocular las bacterias mediante centrifugación del triturado de pulgas o cualquier otra extracción de origen humano o animal infectada por dichas bacterias sobre la capa de células en cultivo de la etapa 1, e incubar a 25 a 30°C, preferentemente a 28°C, hasta la detección de un crecimiento bacteriano,
- 3) establecer las bacterias en cultivo mediante replantes sucesivos sobre unas células en cultivo.

Las bacterias se pueden purificar mediante centrifugación del sobrenadante de cultivo de las células de la etapa 3 prevista anteriormente.

La presente invención tiene asimismo por objeto la detección de un anticuerpo específico de una inmunoglobulina humana que reconoce dicha bacteria, preferentemente IgG, IgM o IgA, y más particularmente una inmunoglobulina animal, en particular una inmunoglobulina anti-humana de cabra.

La presente invención tiene asimismo por objeto un cultivo celular de una bacteria según la invención, y más particularmente de las células de *Xenopus laevis*, preferentemente de las células XTC-2.

Una bacteria según la invención se depositó en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos del Instituto Pasteur - Paris) el 8 de diciembre de 1999 con el n° de registro I-2363, identificado como *Rickettsia pulicis* (URRWFX cal 2) en forma de cultivo celular de células XTC-2 infectadas. Un cultivo de células sanas XTC-2 (no infectadas) fue depositado en la CNCM el 8 de diciembre de 1999 con el n° I-2364.

La presente invención se refiere asimismo al uso de una bacteria, de un cultivo o de un anticuerpo específico según la invención, en un método de diagnóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con unas infecciones por la bacteria *Rickettsia pulicis*, así como a un método para el diagnóstico serológico de la infección mediante la bacteria *Rickettsia pulicis* según la invención, que comprende la puesta en contacto del suero o de cualquier otro líquido biológico de un paciente con dicha bacteria, y la detección de una reacción inmunológica.

Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un método de diagnóstico serológico *in vitro* de las infecciones con *Rickettsia pulicis*, en el que se pone en contacto la bacteria según la invención, o un cultivo según la invención, con una muestra que procede del paciente que consiste en un suero, un fluido biológico, unas pulgas o una extracción humana.

El método según la invención comprende la etapa que consiste esencialmente en detectar una reacción inmunológica entre un anticuerpo específico de una inmunoglobulina según la invención que reconoce dicha bacteria, y dicha inmunoglobulina humana que reconoce dicha bacteria.

En un modo de realización, el método de diagnóstico según la invención comprende:

- el depósito en o sobre un soporte sólido de una disolución de bacteria según la invención, en particular de 0,5 a 5 μ l, preferentemente de 1 μ l, de dicha disolución que contiene dicha bacteria;
- la introducción en o sobre dicho soporte del suero o del fluido biológico a ensayar diluido;
- la introducción en o sobre el soporte de una disolución de un anticuerpo marcada, en particular una inmunoglobulina anti-humana animal específica de la inmunoglobulina humana de tipo IgG, IgM o IgA, que reconoce dicha bacteria;
- la monitorización de un periodo de incubación;
- el aclarado eventual del soporte sólido;
- la detección propiamente dicha de la reacción inmunológica entre un anticuerpo humano que reconoce dicha bacteria y dicha inmunoglobulina anti-humana.

Como soporte sólido, se puede usar cualquier dispositivo adaptado para la manipulación de suspensiones celulares y bacterianas, y en particular unos tubos, unas láminas de vidrio, unos tubos Bijoux o unas placas rígidas de microtitulación de polietileno, poliestireno, cloruro de polivinilo o nitrocelulosa que comprende unos micropocillos, siendo preferidas las láminas de vidrio.

El anticuerpo humano detectado es una inmunoglobulina, en particular de tipo G, M o A, específica de la bacteria según la invención.

Ventajosamente, el método de diagnóstico de la invención usa una dosificación inmunoenzimática de tipo ELISA o una dosificación inmunofluorescente.

ES 2 296 676 T3

Como tipo de marcación de la inmunoglobulina anti-humana, se usa por lo tanto, ventajosamente, un marcado enzimático, radioactivo o fluorescente, siendo este último tipo de marcado preferido.

5 La expresión “marcado fluorescente” significa que el anticuerpo se ha hecho fluorescente mediante acoplamiento o complejación con un agente fluorescente apropiado tal como el iso(tio)cianato de fluoresceína.

10 La expresión “marcado radioactivo” significa que el anticuerpo porta un isótopo radioactivo que permite dosificarlo mediante recuento de la radioactividad que le está asociada, pudiendo el isótopo ser soportado bien en un elemento de la estructura del anticuerpo, por ejemplo los residuos de tirosina constitutivos, o bien en un radical apropiado que se le ha fijado.

15 La expresión “marcado enzimático” significa que el anticuerpo específico se acopla o se compleja con una enzima que, asociada con el uso de agentes reactivos apropiados, permite una medición cuantitativa de este anticuerpo específico.

El sustrato y los agentes reactivos se eligen de manera que el producto final de la reacción o de la secuencia de reacciones provocada por la enzima y utilizando estas sustancias sea:

- 20 - o bien una sustancia coloreada o fluorescente que difunde en el medio líquido que rodea la muestra ensayada y que constituye el objeto, o bien de la medida final espectrofotométrica o fluorimétrica, respectivamente, o bien de una evaluación visual; eventualmente con relación a un abanico de colores calibrados.
- 25 - o bien una sustancia coloreada insoluble que se deposita sobre la muestra ensayada y que puede constituir el objeto, o bien de una medición fotométrica por reflexión, o bien de una evaluación visual, eventualmente con relación a un abanico de colores calibrados.

Cuando se usa un anticuerpo hecho fluorescente, la fluorescencia asociada con la muestra ensayada se lee directamente en un aparato apropiado.

30 Cuando se usa una sonda radioactiva, como por ejemplo el yodo 125, la radioactividad asociada con la muestra ensayada se completa en un contador gamma según cualquier modalidad apropiada y, por ejemplo, después de la solubilización de las células mediante una disolución alcalina (por ejemplo una disolución de sosa) y de la recuperación de la disolución que contiene la radioactividad con la ayuda de un tampón absorbente.

35 Cuando se usa una enzima sobre el anticuerpo específico, la aparición de un producto coloreado o fluorescente se obtiene añadiendo una disolución que contiene el sustrato de la enzima y uno o varios agentes reactivos auxiliares que permiten obtener por último como producto de reacción, o bien un producto coloreado soluble en el medio, o bien un producto coloreado insoluble, o bien un producto fluorescente soluble, como ya se ha explicado anteriormente. Después, se mide la señal luminosa que procede de las muestras así tratadas, con la ayuda de aparatos adaptados para cada caso: fotómetro en transmisión, o en reflexión o fluorímetro, respectivamente. Alternativamente, también se puede evaluar visualmente la coloración obtenida, ayudándose eventualmente de un abanico de disoluciones coloreadas calibradas.

45 Usando como enzima la fosfatasa alcalina, el acoplamiento de esta enzima con el anticuerpo específico se efectúa según el método propuesto por Boehringer Mannheim-Biochemica. Los sustratos preferentes de esta enzima son el paratirofenilfosfato para una lectura fluorométrica o el bromo-5-cloro-4-umbeliferilfosfato para una lectura fluorométrica o el bromo-2-cloro-4-indolil-6-fosfato para obtener un producto de reacción coloreado insoluble. Asimismo, se puede usar como enzima la β -galactosidasa cuyos sustratos preferentes son el ortonitrofenil- β -D-galactopiranosido o el metil-4-umbeliferil- β -D-galactopiranosido.

50 Preferentemente, se pueden acoplar los anticuerpos específicos con la peroxidasa. En este caso el procedimiento de acoplamiento se deriva del descrito por M.B. Wilson y P.K. Nakane en Immunofluorescence and related staining techniques, W. Knapp, K. Kolubar, G. Wicks ed. Elsevier/North Holland. Amsterdam 1978, p. 215-224.

55 Los agentes reactivos usados para revelar la peroxidasa conjugada con los anticuerpos específicos contienen agua oxigenada, sustrato de la enzima, y un cromógeno apropiado, por ejemplo ortofenilendiamina o el ácido azino-2-2'bis (etil-3-tiazolin-sulfónico-6) o ABTS para obtener un producto final de reacción coloreado y soluble en el medio, o bien la diamino-3,3'-bencidina o el amino-3-etil-9-carbazol o el cloro-4- α -naftol para obtener un producto final de reacción insoluble, o bien el ácido parahidroxifenil-propiónico para obtener un producto de reacción fluorescente soluble en el medio.

Otro modo de realización de la invención es el uso de anticuerpos específicos acoplados con la acetilcolinesterasa.

65 La acetilcolinesterasa se acopla con el anticuerpo usando preferentemente un procedimiento derivado del descrito en la patente francesa n° 2 550 799, o un procedimiento que comprende esquemáticamente la preparación de fragmentos del anticuerpo mediante una técnica conocida, la modificación de la enzima mediante reacción con un agente heterobifuncional apropiado, y por último el acoplamiento de los productos así obtenidos. Asimismo, se puede usar otros procedimientos conocidos de construcción de conjugados inmunoenzimáticos en este caso.

ES 2 296 676 T3

La revelación de la actividad enzimática específicamente relacionada con el antígeno reconocido por el conjugado con la acetilcolinesterasa se realiza preferentemente según la técnica bien conocida que usa la acetiltiocolina como sustrato de la enzima y el agente reactivo de Ellman, o ácido ditio-5,5'-nitro-2-benzoico como cromógeno, según cualquier variante adaptada al caso considerado, por ejemplo la descrita por Pradelles *et al.*, en Anal. Chem. 1985, 57:1170-1173.

Los cromógenos citados se usan tal cual o en forma de sales solubles en agua.

El método de diagnóstico serológico de la invención se adapta a un uso en laboratorios de biología y/o de anatomopatología. Para ello, se propone un dispositivo para la realización de este método, que comprende un soporte sólido sobre o en el que se deposita una disolución que contiene la bacteria según la invención, tal como se ha definido anteriormente.

Asimismo, la invención se refiere, según otro aspecto, a un kit para la detección *in vitro* de "*Rickettsia pulicis*". Este kit comprende como componentes:

- una disolución que contiene "*Rickettsia pulicis*" según la invención, aislada y establecida como se ha descrito anteriormente, a título de control positivo;
- una disolución que contiene un anticuerpo específico que reconoce la bacteria según la invención, y/o una disolución que contiene un anticuerpo específico de una inmunoglobulina humana que reconoce la bacteria según la invención, preferentemente marcada;
- eventualmente, una disolución de lavado.

El anticuerpo específico usado en el kit de la invención se marca ventajosamente mediante una sonda radioactiva, una enzima o un agente fluorescente.

Cuando el anticuerpo específico está marcado por una enzima, el kit comprende además el sustrato de la enzima y uno o varios agentes reactivos para visualizar la actividad de la enzima.

Cuando el anticuerpo específico está marcado por un agente fluorescente, se usa preferentemente el iso(tio)cianato de fluoresceína.

Según un modo de realización preferido de la invención, se usa como anticuerpo específico, una inmunoglobulina, en particular una inmunoglobulina de ratón.

La invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la exposición siguiente, dividida en secciones, que se refieren a unos experimentos efectuados con el objetivo de realizar la invención y que se proporcionan a título puramente ilustrativo.

La figura 1 representa el perfil proteico de las bacterias *R. conorii*, *R. pulicis* y *R. thyphi*, ensayadas en el ejemplo 4.

Ejemplo 1

Procedimiento de aislamiento de *R. pulicis* sobre unas células XTC

1- *Primoaislamiento*

El primoaislamiento se ha realizado mediante la técnica de centrifugación sobre unos tubos bijoux inoculados con la línea de células de *Xenopus laevis*, línea XTC-2 [Pudney M, Varma MRG, Leake CJ. Establishment of a cell line (XTC-2) from the south african clawed toad *Xenopus laevis*. Experimentia. 29:466-467]. Estas células se cultivan en un medio Leibowitz-15 con L-glutamina y L-aminoácidos (Gibco, Gaithersburg, MD) adicionado con 5% de suero de ternera fetal (Gibco) y con 2% de triptosa fosfato (Gibco). Los tubos bijoux (Sterilin-Felthan-England, 3,7 ml) que comprenden una lámina de soporte de 12 mm de diámetro se inoculan con 1 ml de medio de cultivo que contiene aproximadamente 50.000 células, se incuban a 28°C durante 24 a 48 horas a fin de obtener una alfombra de células subconfluentes. El aislamiento de la bacteria se ha intentado sobre 2 lotes de pulgas de gato (*Ctenocephalides felis*). Cada lote contenía 50 pulgas. Las pulgas han sido agrupadas en 20 grupos de 5 pulgas (grupos California 1 a 10 y Pete 1 a 10). En cada grupo, se han descontaminado las pulgas mediante una inmersión de 5 minutos en un alcohol metílico al 70% yodado a 0,2%. Las pulgas se han aclarado a continuación en agua destilada y después se han congelado en nitrógeno líquido antes de ser trituradas. Después, las pulgas aplastadas se han recogido con 0,8 ml de medio de cultivo y el triturado se ha usado para inocular los tubos bijoux (1 por triturado). Después, se han centrifugado estos tubos a 700 x g durante 1 hora a 22°C. Se ha retirado después el sobrenadante, se han lavado las alfombras dos veces mediante un tampón PBS estéril, y después se han incubado a 28°C con 1 ml de medio adicionado con cotrimoxazol a una concentración final de 4 µg/ml. Cada semana, el sobrenadante ha sido sustituido por un medio de cultivo fresco. El sobrenadante retirado se ha usado para realizar unas citocentrifugaciones para coloración de Gimenez [Gimenez DF. 1964. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. Stain Technol. 39:135-140]. Cuando la coloración de Gimenez ha

ES 2 296 676 T3

5 permitido detectar unas bacterias intracelulares (entre D15 y D30 después de la inoculación), se han despegado las células de la lámina y se han inoculado sobre una alfombra celular subconfluente, en una caja de cultivo de 25 cm² con 5 ml de medio de cultivo y se han incubado a 28°C. El sobrenadante se ha usado para la detección de *Rickettsia sp.* mediante amplificación y secuenciación del gen de la citrosintasa. Con la excepción del grupo California 1, todos los grupos eran positivos.

2- Propagación del aislado

10 El índice de infección en las cajas de cultivos celulares se ha controlado a continuación, cada 2 días mediante la realización de una coloración de Gimenez sobre las células infectadas del sobrenadante. Cuando el índice de infección ha sido máximo, los cultivos celulares se han replantado sobre unas cajas de cultivo de células XTC-2 sanas subconfluentes de 174 cm² con 30 ml de medio de cultivo. Para la producción masiva de la cepa California 2 (URRWFXCal2) se ha usado una técnica de multiplicación de las células infectadas mediante tripsinación. Cinco a seis días después de la infección de las células XTC-2 en una caja de cultivo de 174 cm², cuando el índice de infección de las células era superior a 80%, se ha retirado el sobrenadante, se ha lavado la alfombra celular mediante Rinaldini y después se ha incubado durante 5 minutos a 37°C con tripsina al 0,05% (Gibco). Las células infectadas se han resuspendido en 150 ml de medio de cultivo. Las células infectadas así diluidas se han repartido en 5 cajas de cultivo de 174 cm² con una cantidad de 30 ml por caja. El mismo procedimiento se ha efectuado para cada caja cada 5 días a fin de producir el equivalente de 200 cajas de cultivo de 174 cm² a fin de obtener un material en cantidad suficiente para los estudios posteriores. La ausencia de contaminantes en los cultivos celulares se ha verificado a lo largo de la producción mediante el cultivo sistemático de las cajas de cultivos recogido sobre gelosa sangre y gelosa tripticosa soja.

3- Microscopía electrónica

25 Se han recogido unas células infectadas, inoculadas 8 días antes por la bacteria, y después se han preparado para el estudio en microscopía electrónica. Las células se han fijado en una disolución de glutaraldehído al 2,5% en tampón PBS 0,15 M (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France) durante 1 hora a 4°C. Las células se han aclarado durante una noche en el mismo tampón y después se han fijado durante 1 hora a temperatura ambiente en un tetróxido de osmio en tampón PBS 0,15 M. Se ha realizado la deshidratación mediante aclarados sucesivos en unas disoluciones de acetona (Carlo Erba, Val de Reuil, Francia) de concentraciones crecientes. Después, las células se han incluido en bloques de Araldite (Fluka, st Quentin Fallavier, Francia). Después, se han cortado unas finas secciones a partir de los bloques con la ayuda de un micrótopo Ultracut (Reichert-Leica, Marsella, Francia) y después se han coloreado mediante una disolución saturada de acetato de uranilo (Merk, Damstadt, Alemania) en metanol y de nitrato de plomo y de citrato de sodio (Merck) en agua antes del examen en un microscopio electrónico Jeol 1220 (Jeol, Croissy sur Seine, Francia). Este examen ha permitido observar las bacterias en localización intracelular, libres en el citoplasma. No se ha observado ninguna bacteria en el núcleo.

Ejemplo 2

40 Producción y caracterización de los anticuerpos policlonales de ratón

Las bacterias usadas para la inoculación en los ratones se han purificado previamente a partir de cajas de cultivos celulares de 174 cm² al 80% de infección. El sobrenadante se ha retirado de las cajas, y las células se han incubado durante 45 minutos a 30°C con una tripsina al 0,5% (Gibco). Después, las células se han recogido con el sobrenadante y después se han lisado mediante 6 etapas de sonicación (40 vatios durante 1 minuto). Después, las células residuales se han retirado mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se ha depositado sobre una disolución de sucrosa al 25% en PBS. Después de una centrifugación de 30 minutos a 7.500 rpm a 4°C, el residuo que contiene las bacterias se ha recogido en 2 ml de PBS. Por último, las bacterias se han purificado mediante centrifugación a 25000 rpm durante 1 hora a 4°C en un gradiente de renografina (45 a 25%). Después de la centrifugación, se ha recogido la capa que correspondía a las bacterias y se han aclarado las bacterias en PBS mediante 2 etapas de centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos.

55 Se han inoculado unos ratones de 6 a 8 semanas por vía intraperitoneal el D0, D10, D20 y D30 con 0,5 ml de una disolución al 10⁶/ml de bacterias purificadas y de adyuvante de Freund. El D40, se han sacrificado los ratones y se ha recolectado la sangre mediante punción intracardiaca. Después de la separación, el suero se ha ensayado mediante inmunofluorescencia indirecta y después se ha congelado a -20°C. Antes de usar, el suero se diluyó al 1:50 y se adsorbió con las células XTC-2 a fin de retirar los anticuerpos anti-ratón.

Ejemplo 3

60 Serodiagnóstico mediante inmunofluorescencia indirecta y transferencia western

1- Preparación del antígeno

65 *Rickettsia pulicis* (URRWFXCal2) se ha cultivado sobre unas alfombras confluentes de células XTC-2 como se ha descrito anteriormente. *R. conorii* (Moroccan strain, ATCC VR 141), *R. prowazekii* (Brein-1) y *R. typhi* (Wilmington strain, ATCC VR 144) se han cultivado sobre unas alfombras confluentes de células Vero en unas cajas de cultivo celulares de 174 cm² a respectivamente 32°C, 35°C y 35°C. Cuando 80% de las células están infectadas, las células

ES 2 296 676 T3

y el sobrenadante se recogen, se centrifugan a 10.000 x g durante 10 minutos, se lavan 4 veces en 40 ml de PBS, y después se resuspenden por último en el volumen más pequeño posible de agua destilada estéril. El contenido final de proteína de esta disolución se mide después mediante espectrofotometría ultravioleta, y después se ajusta a una concentración final de 1 mg/ml antes de la congelación a -20°.

5

2- Inmunofluorescencia indirecta (IFA)

Después, los 4 antígenos se disponen con la ayuda de una pluma en cada pocillo de una lámina de 30 pocillos (Dynatech Laboratories Ltd., Billingshurst, United Kingdom), se secan con aire y después se fijan en acetona durante 10 minutos. Todos los sueros han sido diluidos al 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128 en PBS con 3% de leche en polvo desnatada. La inmunofluorescencia indirecta con determinación de los IgG e IgM después de la adsorción del factor reumatoide se ha realizado mediante la técnica habitualmente usada en el laboratorio [La Scola, B. *et al.* Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. (1997) J. Clin. Microbiol. 35:2715-2727]. Unos títulos de 1/64 en IgG y/o 1/32 en IgM se han considerado como positivos. En caso de reacción serológica cruzada entre varias especies de rickettsias, una reacción serológica se considera como específicamente dirigida contra una especie si la suma de las titulaciones de IgG y de IgM es de al menos dos diluciones superiores a las titulaciones de IgG+IgM contra la o las especies con las que se observa la reacción cruzada.

15

3- Transferencia western

20

Después de la purificación, *R. pulicis*, *R. typhi* y *R. conorii* se han suspendido en agua destilada estéril y se han ajustado a 2 mg/ml. El procedimiento usado para la realización de la transferencia western se ha descrito anteriormente [Eremeeva, M. N., *et al.* Serologic response of patients suffering from primary and recrudescent typhus: comparison of complement fixation reaction, Weil-Felix test, microimmunofluorescence, and immunoblotting. Clin. Diab. Lab. Immunol. (1995) 1:318-324]. Los anticuerpos que reaccionan contra los antígenos de 20-50 kD son específicos del LPS en *R. typhi* y *R. conorii*. La intensidad de la reactividad de las diferentes bandas se ha evaluado mediante adquisición de imagen de vídeo (The Imager, Appligene, Illkirch, Francia).

25

4- Elección de los sueros

30

A fin de evaluar la seroprevalencia contra *R. pulicis* en la población general, se han ensayado 100 sueros de donantes de sangre. A fin de ensayar las reacciones cruzadas entre las serologías contra *R. conorii* y *R. typhi*, se han ensayado unos sueros de fase aguda de 97 pacientes que tenían una fiebre maculosa mediterránea, 16 un tifus murino y 67 un tifus epidérmico. Para el conjunto de estos pacientes, se disponía de datos clínicos y epidemiológicos. El conjunto de estos sueros se ha ensayado contra *R. pulicis*, *R. prowazekii*, *R. typhi* y *R. conorii*.

35

5- Resultados de las serologías

Ninguno de los 100 sueros de donantes de sangre presentaba una serología positiva contra *R. pulicis*.

40

Se ha observado una reacción serológica cruzada entre *R. prowazekii* y *R. pulicis* para 51 de los 67 sueros de pacientes que padecen tifus epidérmico (76,1%). Sin embargo, ninguno de los 67 sueros presentaba una titulación de anticuerpos anti-*R. pulicis* superior a la titulación de anticuerpos dirigida contra *R. prowazekii*, ya sea en IgG o en IgM.

45

Se ha observado una reacción serológica cruzada entre *R. typhi* y *R. pulicis* para 11 de los 16 sueros de pacientes que padecen tifus murino (68,7%). Sin embargo, ninguno de los 16 sueros presentaba una titulación de anticuerpos anti-*R. pulicis* superior a la titulación de anticuerpos dirigida contra *R. typhi*, ya sea en IgG o en IgM.

50

Se ha observado una reacción serológica cruzada entre *R. conorii* y *R. pulicis* para 67 de los 97 sueros de pacientes que padecen fiebre maculosa mediterránea (69,0%). Noventa y seis de los 97 sueros presentaban unas titulaciones de anticuerpo anti-*R. pulicis* inferiores a las titulaciones de anticuerpos dirigida contra *R. conorii*, ya sea en IgG o en IgM. Un paciente presentaba unas titulaciones de anticuerpos contra *R. pulicis* más elevadas de 2 diluciones que contra *R. conorii*, y era por consiguiente sospechoso de infección con *R. pulicis*. Un procedimiento de confirmación mediante transferencia western se ha efectuado sobre este suero, y ha confirmado que este paciente presentaba unos anticuerpos específicamente dirigidos contra *R. pulicis*.

55

Ejemplo 4

60

4.1 Análisis de proteínas mayores mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y transferencia western

Se han purificado unas cepas de rickettsias con la renografina. Se han resuspendido unas preparaciones de proteínas de *R. Pulicis*, *R. typhi*, *R. prowazekii*, *R. canadensis*, *R. conorii* y *R. akari* purificadas con la renografina en un tampón de muestra de SDS-PAGE (Tris 0,625 M, pH 8,0, 2% (m/v) de dodecilsulfato de sodio, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol y 0,002% (m/v) de azul de bromofenol). Una porción alcuota de cada una de ellas se ha calentado después durante 10 minutos a 100°C, y después se han cargado unas porciones alcuotas calentadas y no calentadas sobre unos geles de poliacrilamida con gradiente lineal de 9-16% (18 cm x 20 cm x 1,5 mm). Se han rediseñado las

65

proteínas mediante electroforesis a 40 mA durante 5 horas a 10°C (Laemmli, 1970). Las proteínas redisueltas se han coloreado mediante coloración con plata. Las proteínas inmunógenas mayores se han estudiado mediante transferencia western con la ayuda de antígenos no calentados purificados de la manera descrita anteriormente (Laemmli, 1970; Teyssiere *et al.*, 1992) y de anticuerpos policlonales murinos anti-*R. pulicis*.

4.2 Sensibilidad a los antibióticos

La actividad de la eritromicina contra *R. pulicis* se ha determinado en unas células Vero mediante dosificación colorimétrica mediante la coloración de Gimenez. Se han infectado unos cultivos de células Vero en unas microplacas de titulación de 48 pocillos con 2.000 PFU de rickettsias durante 1 hora a temperatura ambiente, se ha añadido eritromicina con diferentes concentraciones en diferentes filas. Las filas sin medicamentos infectadas con 2.000, 200, 20 y 0 PFU sirven de control. Después de 9 días de incubación de las microplacas a 32°C, se han coloreado unas monocapas de cultivo celular con el colorante de Gimenez para revelar la presencia de focos infectados (montón de rickettsias) en 25 dominios elegidos al azar para cada pocillo. La concentración de antibióticos mínima que permite una inhibición completa de la formación de focos con relación a un control sin medicamento se ha anotado como CIM. Para la doxiciclina y la rifampina, se ha ensayado una sola concentración de 4 µg/ml. Los experimentos se han realizado dos veces para confirmar los resultados. La temperatura de incubación se ha bajado hasta 32°C para permitir el crecimiento de *R. Pulicis*. *R. conorii* y *R. typhi* se han tratado de la misma manera como control.

4.3 Resultados y debate

En la figura 1, se ha representado el perfil SDS-PAGE coloreado con plata de preparaciones proteicas de células enteras de *R. conorii*, *R. Pulicis*, *R. typhi*; pista 1, *R. conorii*; pista 2 *R. Pulicis*; pista 3, *R. typhi*; pista 4, *R. conorii*; pista 5, *R. pulicis*; pista 6, *R. akari*. En los dos extremos del gel se incluyen unos patrones de masa molecular.

Las pistas 1 a 3 corresponden a los antígenos fríos. Las pistas 4 a 6 corresponden a los antígenos calientes.

El perfil de SDS-PAGE de *R. pulicis* era claramente diferente a los obtenidos a partir de *R. typhi* (figura 1), *R. prowazekii*, *R. canadensis*, *R. conorii* (figura 2) y *R. akari*. Tal como *R. conorii*, *R. Pulicis* expresaba una proteína de alta masa molecular que tiene una masa molecular superior a 150 kDa, lo que no era el caso de *R. typhi* y *R. prowazekii*. *R. pulicis* expresaba asimismo una proteína termolábil de 30 kDa, que no se observaba en los perfiles de otras rickettsias estudiadas. Así, el perfil proteico en SDS-PAGE de la cepa según la presente invención es claramente diferente del de "*R. felis*" del que se ha constatado anteriormente que se parecía estrechamente al de *R. typhi* en cuanto a la transferencia western (Radulovic *et al.*, 1995b; Higgins *et al.*, 1996; Azad *et al.*, 1997), mientras que se ha demostrado que los antígenos inmunógenos de *R. pulicis* se podían discernir de los de *R. typhi* en un suero humano que reacciona específicamente a *R. pulicis* y en unos antisueros murinos producidos contra el aislado purificado, debido a una reacción contra el antígeno de 30 kDa.

La fluorescencia y la doble coloración de actina y de bacterias se han realizado para evaluar la aptitud de *R. pulicis* para polimerizar la actina intracelularmente. La polimerización polar de la actina no se ha observado en unas células infectadas por *R. pulicis* o *R. typhi* al contrario de aquel infectadas por *R. conorii*. Parece que la polimerización de la actina está asociada con la aptitud para crecer en el interior del núcleo, una característica común a unas rickettsias del grupo de la fiebre maculosa estudiada hasta ahora, pero ausente del grupo del tifus y *R. pulicis* (Heinzen *et al.*, 1993 ; Teyssiere *et al.*, 1992; Burgdorfer *et al.*, 1968).

Para *R. pulicis*, la CIM para la eritromicina era de 32 µg/ml, y una concentración de 4 µg/ml de doxiciclina o de rifampina era inhibitoria. Los resultados obtenidos para los controles eran idénticos a los obtenidos anteriormente (Rolain *et al.*, 1998). El aislado de *R. pulicis* es resistente a la eritromicina, mientras que la sensibilidad a este antibiótico era una característica limitada a las rickettsias del grupo del tifus (Rolain *et al.*, 1998), y la bacteria denominada "*R. felis*" (Radulovic *et al.*, 1995a; Radulovic *et al.*, 1996).

Los genes *rOmpA* y *rpoB* han sido secuenciados de la base 3539 a la base 6722 y de la base 1 a la base 3866 respectivamente. Para *rpoB*, las similitudes de secuencias eran de 96% (*R. massiliae*, Bar 29, *R. conorii*) a 87% para las secuencias nucleotídicas. La similitud de secuencia era de 92% entre *R. pulicis* y *R. prowazekii*. Para las secuencias de aminoácidos, las similitudes eran de 98% (*R. massiliae*, Bar 29, *R. conorii*) a 83% (*R. typhi*). La similitud de secuencia era de 96% entre *R. pulicis* y *R. prowazekii*. Los dendrogramas obtenidos a partir de *rOmpA* con los tres métodos de construcción de árboles diferentes utilizados presentaban una posición filogenética similar para *R. pulicis*. Formaban unos montones con *R. australis* con un valor de muestreo aleatorio de 100%.

Unos datos adicionales que pueden diferenciar la cepa *R. pulicis* de la cepa "*R. felis*" ahora perdida son la temperatura de crecimiento. *R. pulicis* no crecía a 35 ó 37°C, mientras que se ha descrito que "*R. felis*" inducía un efecto citopático que conduce a la formación de pequeñas áreas tardías cuando se cultivaba a 34°C en unas células Vero, unas HUVEC o unas células L929 (Radulovic *et al.*, 1995b). Además, incluso a 28°C, *R. pulicis* no tenía la capacidad de crecer sobre unas células L929. Estos resultados demuestran que el aislado de "*R. felis*" ahora perdido no era el mismo organismo que el recuperado de manera repetida a partir de pulgas de gatos infectadas obtenidas de la colonia de El Laboratory. La descripción fenotípica del aislado de *R. pulicis* es claramente diferente de la del aislado de "*R. felis*" original. Además, los inventores han sido capaces de aislar solamente *R. typhi* a partir de depósitos de la cepa "*R. felis*" original que se han suministrado a su laboratorio después de su aislamiento descrito.

ES 2 296 676 T3

	Carácter	<i>R. conorii</i>	<i>R. typhi</i>	<i>R. pulicis</i>	" <i>R. felis</i> "
	Crecimiento posible a:				
5	28°C	+	+	+	NF
	32°C	+	+	+ (débil)	NF
	34°C	+	+	-	+
	Crecimiento posible sobre:				
10	Células XTC-2	+	+	+	NF
	Células Vero	+	+	+	+
	Células L-929	+	+	-	+
	Localización en el:				
15	Citoplasma	+	+	+	+
	núcleo	+	-	-	-
	Polimerización de la actina	+	-	-	NF
	Inhibición mediante 4µg/ml de:				
20	Doxiciclina	+	+	+	+
	Rifampina	+	+	+	+
	Eritromicina	-	+	-	+
	Proteínas sobre SDS-PAGE				
25	150 kDa	+	-	+	-
	30 kDa	-	-	+	-
	17 kDa	+	+	+	+
	Genes detectados				
30	<i>OmpA</i>	+	-	+	-
	<i>OmpB</i>	+	+	+	+

35 **Adams, J.R., Schmidtman, E.T., y Azad, A.F. (1990).** Infection of colonized catfleas, *Ctenocephalides felis* (Bouché), with a rickettsia-like microorganism. *Am J Trop Med Hyg* 43, 400-409.

40 **Azad, A.F., Sacci, J.B., Nelson, W.M., Dasch, G.A., Schmidtman, E.T., y Carl, M. (1992).** Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 43-46.

45 **Azad, A.F., Radulovic, S., Higgins, J.A., Noden, B.H., y Troyer, J.M. (1997).** Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg Infect Dis* 3, 319-327.

50 **Bouyer, D.H., Crocquet-Valdes, P.A., y Walker, D.H. (2000).** Expression and size determination of the rOmpA protein of *Rickettsia felis*. In *American Society for Rickettsiology - 15th meeting*. p. 61-61.

55 **Burgdorfer, W., Anacker, R.L., Bird, R.G., y Bertram, D.S. (1968).** Intranuclear growth of *Rickettsia rickettsii*. *J Bacteriol* 96, 1415-1418.

60 **Drancourt, M., Raoult, D. (1999).** Characterization of mutations in rpoB gene in naturally rifampin-resistant *Rickettsia* species. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2400-2403.

65 **Fournier, P.E., Roux, V., Raoult, D. (1998).** Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol* 48, 839-849.

70 **Heinzen, R.A., Hayes, S.F., Peacock, M.G., y Hackstad, T. (1993).** Directional actin polymerization associated with spotted fever group rickettsia infection of Vero cells. *Infect Immun* 61, 1926-1935.

75 **Higgins, J.A., Radulovic, S., Schriefer, M.E., y Azad, A.F. (1996).** *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic rickettsia isolated from cat fleas. *J Clin Microbiol* 34, 671-674.

80 **La Scola, B., y Raoult, D. (1996).** Diagnosis of Mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6 year follow-up. *J Clin Microbiol* 34, 2722-2727.

85 **Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

ES 2 296 676 T3

Murray, R.G.E., y **Schleifer, K.H.** (1994). Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int J Syst Bacteriol* 44, 174-176.

5 **Noden, B.H., Radulovic, S., Higgins, J.A., y Azad, A.F.** (1998). Molecular identification of *Rickettsia typhi* and *R.felis* in co-infected *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 35, 410-414.

Radulovic, S., Higgins, J.A., Jaworski, D.C., y Azad, A.F. (1995a). *In vitro* and *in vivo* antibiotic susceptibilities of ELB rickettsiae. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2564-2566.

10 **Radulovic, S., Higgins, J.A., Jaworski, D.C., Dasch, G.A., y Azad, A.F.** (1995b). Isolation, cultivation, and partial characterization of the ELB agent associated with cat fleas. *Infect Immun* 63, 4826-4829.

Radulovic, S., Higgins, J.A., Jaworski, D.C., y Azad, A.F. (1996). *In vitro* and *in vivo* antibiotic susceptibilities of ELB rickettsiae (vol 39, p. 2564, 1996). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 2912.

15 **Rolain, J.M., Maurin, M., Vestris, G., y Raoult, D.** (1998). *In vitro* susceptibilities of 27 Rickettsiae to 13 antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1537-1541.

20 **Teyssere, N., Chiche-Portiche, C., y Raoult, D.** (1992). Intracellular movements of *Rickettsia conorii* and *R. typhi* based on actin polymerization. *Res Microbiol* 143, 821-829.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 296 676 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cultivo celular de una bacteria *Rickettsia* que corresponde al agente ELB, aislada y establecida en cultivo de manera reproducible, que se puede obtener mediante un método en el que:
- 1) se realiza un cultivo de células, preferentemente de células de *Xenopus laevis*, a la temperatura de cultivo de 25 a 30°C, preferentemente de 28°C, y
 - 10 2) las bacterias se inoculan mediante centrifugación del triturado de pulgas o cualquier otra extracción de origen humano o animal infectada por dichas bacterias, sobre la capa de células en cultivo de la etapa 1, y se incuban a 25 a 30°C, preferentemente a 28°C, hasta la detección de un crecimiento bacteriano,
 - 15 3) las bacterias se establecen en cultivo mediante replantes sucesivos sobre unas células en cultivo.
2. Cultivo celular de la bacteria *Rickettsia* que corresponde al agente ELB según la reivindicación 1, depositada en la CNCM del Instituto Pasteur el 8 de diciembre de 1999, con el nº de recepción I-2363.
3. Cultivo celular según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque las células son unas células de *Xenopus laevis* infectadas por dicha bacteria, siendo dichas células obtenidas a partir de las células sanas XTC-2 depositadas en la CNCM del Instituto Pasteur el 8 de diciembre de 1999 con el nº de registro I-2364.
4. Bacteria *Rickettsia* que corresponde al agente ELB aislada y purificada después de la centrifugación del sobrenadante de un cultivo celular según unas de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 5. Uso de una bacteria según la reivindicación 4, o de un cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 4, para el diagnóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con unas infecciones por dicha bacteria.
- 30 6. Método de diagnóstico serológico *in vitro* de una infección por la bacteria *Rickettsia* que corresponde al agente ELB, **caracterizado** porque se pone en contacto una bacteria según la reivindicación 4, o un cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 3, con una muestra procedente de un paciente que consiste en un suero, un fluido biológico o una extracción humana, y se detecta una reacción inmunológica.
- 35 7. Método según la reivindicación 6 para el diagnóstico serológico *in vitro* de *Rickettsia*, que comprende la etapa que consiste esencialmente en detectar una reacción inmunológica entre un anticuerpo específico de una inmunoglobulina humana que reconoce la bacteria según la reivindicación 4 y una inmunoglobulina humana que reconoce dicha bacteria según la reivindicación 4.
- 40 8. Método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque dicho anticuerpo específico de una inmunoglobulina humana, preferentemente de tipo G, M o A, es una inmunoglobulina antihumana animal, preferentemente de cabra.
9. Método de diagnóstico serológico según una de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende las siguientes etapas:
- 45 - el depósito en o sobre un soporte sólido de una disolución que contiene la bacteria tal como se define en la reivindicación 4,
 - la introducción en o sobre dicho soporte del suero o del fluido biológico a ensayar,
 - la introducción en o sobre el soporte de una disolución de un anticuerpo marcado específico de una inmunoglobulina humana que reconoce dicha bacteria,
 - 50 - la observación de un periodo de incubación,
 - el aclarado del soporte sólido, y
 - 55 - la detección de dicha reacción inmunológica.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo marcado se marca mediante una sonda radioactiva de una enzima o de un agente fluorescente.
- 60 11. Método según la reivindicación 10, en el que el agente fluorescente es el isotiocianato de fluoresceína.
12. Método según una de las reivindicaciones 9 a 11, en el que se usan 0,5 a 5 µl, preferentemente aproximadamente 1 µl, de dicha disolución que contiene dicha bacteria.
- 65 13. Dispositivo para la realización del método según una de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende un soporte sólido en o sobre el que se había dispuesto la disolución que comprende dicha bacteria.

ES 2 296 676 T3

14. Dispositivo según la reivindicación 13, según el cual el soporte sólido es una lámina de vidrio.

15. Kit para la detección *in vitro* de la bacteria *Rickettsia* que corresponde al agente ELB, según el método de una de las reivindicaciones 6 a 12, que comprende esencialmente como componentes:

5

- una disolución que contiene la bacteria o un cultivo celular tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 4 y, preferentemente,

10

- una disolución que contiene un anticuerpo específico de una inmunoglobulina humana que reconoce dicha bacteria según la reivindicación 4.

16. Kit según la reivindicación 15, **caracterizado** porque dicho anticuerpo específico está marcado.

15

17. Kit según la reivindicación 16, **caracterizado** porque dicho anticuerpo específico está marcado por un isótopo radioactivo, una enzima o un compuesto fluorescente.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

