

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



DESARROLLO DE MICROINMUNOENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO: Santiago Moriana Martínez

TUTOR: Sergi Morais Ezquerro

COTUTOR: Manuel Hernández Pérez

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, 1 de Septiembre de 2015

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial – Sin Obra Derivada"



DESARROLLO DE MICROINMUNOENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS

RESUMEN

En la industria agroalimentaria el análisis microbiológico es una actividad necesaria para poder comercializar productos sin riesgo para la salud del consumidor. Algunos microorganismos son capaces de provocar enfermedades muy graves que pueden causar la muerte. La septicemia o sepsis es una de estas enfermedades caracterizada por una respuesta inflamatoria sistémica del organismo ante una infección. En España afecta a unas 50.000 personas cada año, de las que mueren 17.000. En el mundo, ocho millones de pacientes mueren cada año. Las bacterias gram-negativas son, entre otros agentes, los principales responsables de la sepsis a causa de unas estructuras moleculares complejas situadas en su membrana externa conocidas como lipopolisacáridos o endotoxinas. La septicemia se combate con antibióticos como la polimixina B, sin embargo es vital disponer de herramientas analíticas sensibles para reducir la tasa de mortalidad, ya que contar con un diagnóstico rápido es imprescindible dentro del protocolo de actuación para el tratamiento de la sepsis.

En este trabajo se desarrolla un sistema analítico basado en microinmunoensayos de bajo coste, rápido, portátil y sensible para la determinación de endotoxinas. Los microinmunoensayos se basan en el reconocimiento molecular específico entre la polimixina B y endotoxinas tipo lipopolisacáridos (LPS). El ensayo se ha desarrollado en formato de micromatriz sobre un disco compacto, utilizando LPS de *Escherichia coli* O26 como sistema modelo y un lector/grabador de discos como detector. La aproximación analítica permite 20 microinmunoensayos simultáneos para la detección de lipopolisacáridos en un tiempo inferior a 70 minutos alcanzando un límite de detección de 1,4 µg/L.

PALABRAS CLAVES

Micromatriz, *Escherichia coli*, anticuerpo, endotoxina, disco compacto, polimixina B (PmB), lipopolisacárido (LPS), sepsis, microinmunoensayo.

Alumno: D. Santiago Moriana Martínez

Tutor: Prof. D. Sergi Morais Ezquerro

Cotutor: Prof. D. Manuel Hernández Pérez

Valencia, septiembre de 2015

DEVELOPMENT OF MICROIMMUNOASSAYS FOR THE DETERMINATION OF ENDOTOXINS

ABSTRACT

In the food industry the microbiological analysis is needed to market products without risk to consumer health activity. Some microorganisms are capable of causing serious disease that can cause death. Septicaemia is one of these diseases characterized by a systemic inflammatory response of the body to an infection. In Spain it affects about 50.000 people each year, of which 17.000 die. Worldwide, eight million patients passed away each year. Gram-negative bacteria are include other agents primarily responsible for sepsis because of complex molecular structures in their outer membrane known as lipopolysaccharides or endotoxins. Sepsis is treated with antibiotics such as polymyxin B, however it is important to have sensitive analytical tools to reduce the mortality rate, as have a rapid diagnosis is essential in the protocol for the treatment of sepsis.

In this work, microimmunoassays an analytical system based low cost, fast, portable and sensitive for the determination of endotoxins is developed. The microimmunoassay is based on specific molecular recognition between polymyxin B and endotoxin lipopolysaccharides type (LPS). The test was developed in microarray format on a compact disc, using *Escherichia coli* O26 LPS as a model system and a reader/writer drives as detector. The microarray-based analysis system enables to perform 20 microimmunoassays simultaneously for detecting lipopolysaccharide in less than 70 minutes time reaching a detection limit of 1,4 µg/L.

KEY WORDS

Microarray, *Escherichia coli*, antibody, endotoxin, compact disc, Polymyxin B (PmB), lipopolysaccharide (LPS), sepsis, microimmunoassay.

Student: D. Santiago Moriana Martínez

Tutor: Prof. D. Sergi Morais Ezquerro

Cotutor: Prof. D. Manuel Hernández Pérez

Valencia, September 2015

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Determinación de microorganismos.....	2
1.2. Inmunoensayo	3
1.2.1. Polimixina B	6
1.2.2. Lipopolisacárido (LPS).....	8
1.3. Tecnología de disco compacto	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Reactivos	13
3.1.1. Tampones.....	13
3.2. Cultivos	13
3.3. Equipos.....	14
3.4. Material	14
3.5. Métodos.....	14
3.5.1. Conjugación con oro coloidal	14
3.5.2. Microinmunoensayos	15
3.5.2.1. Ensayo A	15
3.5.2.2. Ensayo B.....	16
3.5.2.3. Ensayo C.....	17
3.5.2.4. Ensayo D	17
3.5.3. Recuentos de microorganismos	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Ensayo A.....	20
4.2. Ensayo B	22
4.3. Ensayo C	24
4.4. Ensayo D.....	25
5. CONCLUSIONES.....	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de una curva de calibrado de un inmunoensayo sándwich.	6
Figura 2. Estructura química de Polimixina B ₁	7
Figura 3. Lipopolisacárido completo de <i>Escherichia coli</i>	9
Figura 4. Prototipo de lector utilizado en los ensayos.	11
Figura 5. Diseño del disco segmentado en 20 matrices de 16 puntos.	15
Figura 6. Esquema del ensayo A.	15
Figura 7. Esquema del ensayo B.	16
Figura 8. Esquema del ensayo C.	17
Figura 9. Esquema del ensayo D.	18
Figura 10. Curva del ensayo A empleando GAR-Au.	21
Figura 11. Curva del ensayo A empleando GAR-HRP.	21
Figura 12. Curva del ensayo B.	23
Figura 13. Curva del ensayo C.	24
Figura 14: Curva del ensayo D empleando pAb-HRP.	26

1. INTRODUCCIÓN

En la sociedad actual el control microbiológico de alimentos se ha convertido en una rutina que imprescindiblemente se tiene que llevar a cabo para poder comercializar productos alimenticios. Sin el debido control microbiológico existe el riesgo de aparición de brotes que pueden originar enfermedades graves o incluso la muerte. Uno de los casos más llamativos de los últimos años tuvo lugar en Alemania en 2011 y se conoce como la "Crisis del pepino". Este acontecimiento estuvo provocado por la contaminación de productos alimenticios con una cepa de *Escherichia coli* enterohemorrágica (O104:H4) que provocó 32 muertos y más de un millar de afectados. Esta crisis inicialmente se pensaba que tuvo origen a partir de una contaminación de los pepinos españoles exportados, demostrándose finalmente que el verdadero origen fueron los brotes de soja y otras semillas cultivadas en Alemania (Keller, 2011).

Escherichia coli y *Salmonella spp.* son principalmente los responsables de la mayoría de toxiinfecciones alimentarias y muertes registradas que guardan relación con los alimentos. De ahí que una de las necesidades de la industria alimentaria sea realizar controles microbiológicos para preservar la salud pública. Este control debe emplear una metodología de ensayo rápida que pueda ser implementada en la cadena de producción y así poder analizar muestras en los puntos de control críticos sin tener que detener la producción. Paralelamente, se han desarrollado técnicas de determinación de endotoxinas ya que existe una relación directa entre el contenido de endotoxinas (lipopolisacáridos) y la detección de microorganismos. La determinación de estas estructuras tiene principalmente un enfoque clínico, destinado a conocer el origen de enfermedades (principalmente la sepsis) y descubrir la manera de disminuir su incidencia en la población.

El estudio de lipopolisacáridos se inició en la década de los años 50, pero su auge se produjo en los años 70, cuando se estableció la estructura del LPS de *Salmonella typhimurium*. A partir de ella y gracias a ensayos basados en reacciones bioquímicas, inmuoquímicas y estudios genéticos se ha conseguido reunir una gran cantidad de información de estas moléculas, sobre todo en relación a su carácter tóxico (Rojas, 1995).

Las primeras técnicas de detección de endotoxinas consistían en realizar una inyección intravenosa en animales de laboratorio y medir la subida de temperatura que sufría el animal (prueba de pirógenos en animales, fundamentalmente en conejos). Este tipo de pruebas han caído en desuso debido al alto coste y al largo tiempo necesario para la respuesta del sistema inmune del animal. Actualmente solo se utilizan en combinación con la prueba de lisado de amebocito de *Limulus* (LAL).

La prueba de LAL y sus derivados como la prueba del gel-coágulo, se fundamentan en el uso de geles formados a partir de la sangre de cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus*) y la adición de la muestra con endotoxina. El gel coagula en función de la concentración de LPS en la muestra. Este es un ensayo lento que requiere varias horas ya que para determinar la concentración de LPS es necesario realizar varios ensayos de diferente sensibilidad con la misma muestra con endotoxina en varios geles de diferentes características. El umbral entre muestras pirogénicas (que causan respuesta del sistema inmune) o no pirogénicas se establece en 5 UE/mL (unidades de endotoxina), siendo cada UE aproximadamente 100 pg de LPS.

A partir de estas, se ha ido avanzando en el desarrollado de técnicas nuevas que tienen gran aplicación en la actualidad. Una es la técnica del LAL turbidimétrico, que se basa en la adición de coagulígeno en cantidad suficiente para formar turbidez, pero no como para formar coágulo. Posteriormente, la medida de turbidez está directamente relacionada con la concentración de LPS. Esta técnica tiene mayor capacidad cuantitativa que el ensayo de gel-coágulo y permite cuantificar endotoxinas en un intervalo de concentraciones de 0,01 a 100 UE/mL.

Otra técnica derivada del sistema LAL es el LAL cromogénico, fundamentado en añadir un sustrato cromogénico en lugar del coagulígeno. Dicho sustrato cromogénico es hidrolizado por la enzima pre-coagulación dando una sustancia de coloración amarilla (p-nitroanilina). En función de la cantidad de endotoxina en la muestra, el sustrato cromogénico se hidroliza más rápidamente (si hay mayor concentración de LPS) y en función de ese tiempo de hidrólisis se determina la concentración de endotoxina.

Estas últimas dos técnicas tienen importantes desventajas. En primer lugar no se pueden utilizar fluidos que poseen cierta turbidez inherente (por ejemplo sangre) o líquidos que tengan coloración amarilla (como la orina). Además también puede verse afectadas por precipitaciones de sales que se produzcan durante el ensayo (de Oliveira Magalhães et al., 2007). Por otro lado, los métodos basados en LAL necesitan sangre de cangrejo de herradura, la cual es cara y difícil de adquirir (un litro de sangre de cangrejo de herradura se comercializa con un precio aproximado de 13.000 €). Por todo ello, actualmente se están estudiando nuevas técnicas para la determinación de endotoxinas.

1.1. Determinación de microorganismos

El análisis de la presencia de microorganismos en alimentos actualmente es realizado por las empresas mediante técnicas microbiológicas clásicas que se basan en la siembra en medios de cultivo (eligiendo un medio más general o uno más restrictivo según el microorganismo buscado y los intereses del ensayo), el recuento de microorganismos se realiza a partir de diluciones seriadas y la identificación de microorganismos se lleva a cabo mediante pruebas bioquímicas. Estas técnicas solamente distinguen las células que son capaces de formar colonias (u.f.c) y tienen una gran sensibilidad ya que detectan hasta una sola célula viable en la muestra. Además en comparación con otras técnicas analíticas, los ensayos microbiológicos clásicos tienen un reducido coste económico. Sin embargo, tienen el gran inconveniente de que se necesita como mínimo un día hasta que aparezcan los primeros resultados (debido a que es necesario incubar las muestras esperando que se reproduzca el microorganismo y origine una colonia visible), y si se desea realizar análisis en mayor profundidad y complejidad el tiempo de ensayo puede extenderse hasta más de tres días. Esto supone un inconveniente para las empresas agroalimentarias, ya que tienen que esperar para sacar sus lotes de producto al mercado a que se sepan los resultados de las pruebas.

Los métodos microbiológicos clásicos tienen el inconveniente añadido de la necesidad de trabajar en condiciones asépticas para que no se produzca contaminación de la muestra y así evitar la obtención de resultados erróneos.

Existen métodos de recuento (cuantificación) automatizados basados en las técnicas microbiológicas junto con el uso de reactivos fluorescentes. Estos reactivos aplicados sobre los microorganismos que producen luz al incidirles un láser, posteriormente un software realiza el tratamiento de los datos y obtiene el resultado final utilizando la técnica estadística del número más probable (NMP). Una variante de estos métodos es el test de bioluminiscencia, que detecta y cuantifica el ATP presente en los microorganismos con luciferin-luciferasa (Biotrace, 1960). El inconveniente de estos métodos es que no identifica a los microorganismos, solo advierte su presencia y su número.

Otro tipo de metodologías para la identificación de microorganismos son las técnicas moleculares, entre las que podemos encontrar: la hibridación en fase líquida (basada en la detección de emisión de luz provocada por la unión del éster de acrilamida al ARN mensajero del microorganismo diana), los kits basados en la hibridación mixta (de una sonda de captura y una detectora que emite luz a una cadena de ARN mensajero del microorganismo) y los biochips (basados en la hibridación de un segmento de ADN del microorganismo con una cadena de ADN complementaria inmovilizada sobre un soporte sólido). Pero la técnica molecular más empleada es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que se basa en la replicación de un segmento del material genético del microorganismo diana mediante una reacción enzimática. La PCR tiene diferentes variantes, destacando entre ellas la PCR a tiempo real, basada en el uso de reporteros fluorescentes que indican el estado de la reacción (Costa, 2004).

Las técnicas moleculares tienen una elevada precisión, sin embargo sólo la PCR a tiempo real es capaz de cuantificar (además de secuenciar y tiene menor tiempo de ensayo que una PCR convencional). Pero el mayor inconveniente de estos métodos es la necesidad de personal altamente cualificado, material muy específico (termocicladores, geles de agarosa...) y algunos reactivos, como los cebadores, tienen que ser diseñados expresamente para cada analito diana. En el caso de la PCR a tiempo real, los reactivos fluorescentes y el elevado coste del equipo constituyen otros dos grados inconvenientes. Además, las técnicas basadas en la PCR no son portátiles y tienen una metodología de ensayo y un fundamento complejo, lo que hace inviable que estas técnicas se utilicen de método rápido ni puedan ser implantadas en los puntos de control crítico de la producción en la industria agroalimentaria. Sin embargo, las técnicas moleculares se convierten en unas técnicas excelentes de confirmación tras la aplicación de un método de screening (Kulagina et al., 2006).

1.2. Inmunoensayo

De entre todas las técnicas con potencial para la detección de microorganismos hay que destacar a los ensayos con fundamento inmunológico.

El inmunoensayo es una técnica analítica que tiene como fundamento el reconocimiento molecular específico y selectivo. El anticuerpo es una proteína, producida normalmente por el sistema inmunológico, que posee en su estructura centros activos capaces de realizar el reconocimiento sobre el antígeno. Este reconocimiento crea interacciones altamente específicas que le aportan a esta técnica una alta sensibilidad y selectividad.

Las principales ventajas de este tipo de ensayos son la rapidez y la facilidad para realizarlos, además de tolerar la automatización y tener características de portabilidad en función del método de generación de señal empleado. Además su coste en comparación con las metodologías alternativas (métodos cromatográficos de referencia) es asequible.

Sin embargo es necesario realizar una optimización del ensayo porque pueden haber muchos factores que afecten a la calidad del análisis, como son: reactividad cruzada, efecto matriz, reconocimiento inespecífico, temperatura de ensayo, etc.

La generación de señal de esta metodología analítica se produce por el uso del anticuerpo de reconocimiento marcado con alguna sustancia que genere una señal cuantificable. Hay diversas sustancias aptas para marcar (conjugarse) anticuerpos: inorgánicas (plata, oro, isótopos radioactivos...), enzimáticas (peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, galactosidasa, etc.), sustancias luminiscentes, etc. Todos estos reactivos también necesitan un proceso de optimización.

La optimización de estas variables es diferente según el tipo de inmunoensayo: no competitivo o sándwich (basado en el reconocimiento directo del antígeno, a mayor señal mayor concentración de analito en la muestra), competitivo (uso de analito marcado a concentración conocida y analito no marcado, a mayor señal menor concentración del analito de la muestra), homogéneo (mantiene el anticuerpo marcado que se ha unido al analito y el marcado que no se ha unido) y heterogéneo (necesita la eliminación del anticuerpo marcado que no se ha unido con el antígeno).

Actualmente hay cinco técnicas desarrolladas de inmunoensayo que se basan prácticamente en la elección de la sustancia de marcaje del anticuerpo: radioinmunoensayo (marcaje del anticuerpo con sustancias radioactivas), inmunoensayo enzimático (marcaje del anticuerpo con enzimas que convierten el sustrato en un producto coloreado), inmunoensayo por polarización de fluorescencia (medición de la intensidad de la fluorescencia provocada por el fluoróforo conjugado con el anticuerpo de reconocimiento), inmunoensayo por micropartícula (se cubre la superficie de una micropartícula sólida con anticuerpos de captura y se usan anticuerpos de reconocimiento conjugados con alguna sustancia de marcaje) e inmunoensayo magnético quimioluminiscente (se conjuga el anticuerpo de reconocimiento con una sustancia quimioluminiscente). El desarrollo de los inmunoensayos comenzó en la década de los 60 utilizando la técnica del radioinmunoensayo y desde entonces esta técnica analítica ha sido utilizada en diversos campos de investigación de los que cabe destacar la Química Clínica donde se utiliza para determinar numerosos compuestos y estructuras como drogas, virus, hormonas y contaminantes (Abbott División Diagnóstico, 1998).

En la industria agroalimentaria también existen varias técnicas de screening basadas en inmunoensayos desarrollados con fines muy específicos para la detección de microorganismos. Las reacciones de inmunoprecipitación (utilizada también en los test de embarazo) y las de aglutinación son dos ejemplos de técnicas de screening muy utilizadas. De este último tipo la más empleada es la aglutinación con partículas de látex, que se basa en provocar una aglutinación de partículas de látex conjugadas con anticuerpos que reconocen el analito, el cual actúa como puente entre las partículas de látex, uniéndolas y originando unos resultados visuales similares a una coagulación.

Estas técnicas tienen tiempos de ensayo muy cortos (tan solo unos minutos) pero solamente sirven para detectar la presencia del microorganismo, no sirven para la cuantificación y la mayoría de ellas tampoco sirven para la identificación del microorganismo o microorganismos que están presentes.

Sin embargo, de todos los inmunoensayos hay que destacar el método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que constituye una técnica ampliamente utilizada debido a sus características. El método ELISA se basa en inmunoensayos con formato tipo sándwich, empleando anticuerpos específicos del microorganismo o su toxina como molécula de captura (inmovilizada en el soporte) y como reconocimiento. Como generación de señal emplea una gran diversidad de métodos siendo el más empleado la generación de un producto cromogénico cuando se lleve a cabo el reconocimiento específico. Este método permite la automatización y es empleado para la detección de múltiples microorganismos en la industria agroalimentaria. Existe una versión modificada del método ELISA denominada ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay) en la que se sustituye el producto final cromogénico del ELISA por un producto fluorescente. En algunas ocasiones se puede emplear una técnica de separación inmunomagnética (inmuncaptura) que permite la concentración del analito en la muestra, esto permite reducir el tiempo de ensayo en un ELISA (Herranz Sorribes, 2008).

El método ELISA y sus variantes, que tienen un tiempo de ensayo de 2 horas y permiten la identificación y la cuantificación. Sin embargo tienen el inconveniente de que reconocen tanto microorganismos viables como muertos. Además requieren tecnología compleja en comparación con los métodos microbiológicos clásicos (reactivos fluorescentes, fluorímetro, placas de titulación...). Aun con estos inconvenientes, los métodos inmunológicos tienen una excelente aplicación como técnicas analíticas, y por ello se ha decidido basar este trabajo en el fundamento del método ELISA.

Este tipo de metodología posee una serie de parámetros analíticos obtenidos a partir de la curva de calibrado (Figura 1):

- Límite de detección (LD): concentración de analito obtenida a partir de la medida de un blanco más 3 veces su desviación estándar.
- Límite de cuantificación (LC): concentración de analito obtenida a partir de la medida de un blanco más 10 veces su desviación estándar. La concentración de analito se determina interpolando la señal obtenida en la ecuación de la recta (Ecuación 1) en su intervalo de trabajo:

$$y = \text{mín} + \frac{(\text{máx} - \text{mín})}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{-\text{pendiente}}}$$

Ecuación 1. Ecuación de la curva con ajuste sigmoideal.

- Intervalo de trabajo (RD): es la zona del tramo lineal de la curva, correspondiente a la señal comprendida entre el 20% y el 80% de la máxima.
- Sensibilidad (EC_{50}): concentración de analito que produce un 50% de la señal máxima.

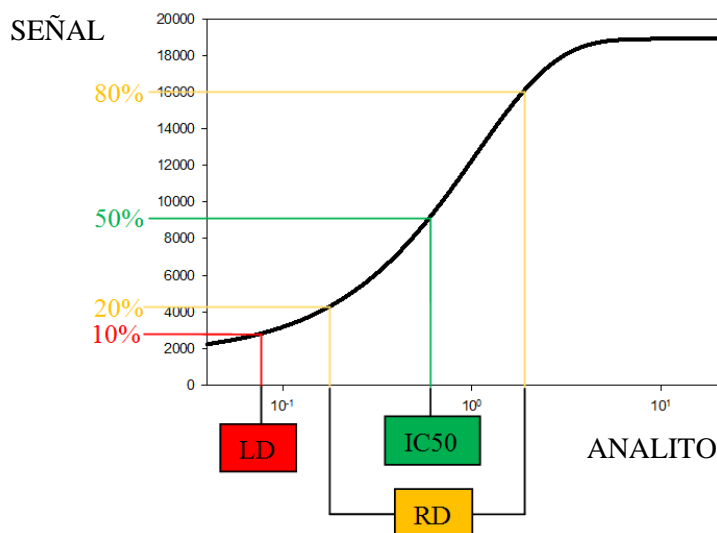


Figura 1. Representación gráfica de una curva de calibrado de un inmunoensayo sándwich.

1.2.1. Polimixina B

Existen muchos antibióticos con acción sobre los microorganismos pero son de especial interés los péptidos antimicrobianos (AMP) y su principal mecanismo de acción se basa en la disrupción de la membrana plasmática. Las polimixinas B y E, cecropina A, magainina I y parasin son algunos ejemplos de este tipo de antibióticos que se obtienen a través de la síntesis natural producida por microorganismos y organismos superiores. Estos péptidos son interesantes debido a su afinidad por ciertos microorganismos (cada péptido tiene mayor afinidad por un tipo de microorganismo) pero también poseen un amplio rango de acción contra muchas especies microbianas, algunos como la polimixinas son capaces de distinguir entre serotipos. Por lo tanto, el uso de estos péptidos antimicrobianos permite desarrollar ensayos de reconocimiento molecular con elevada afinidad para un gran número de microorganismos aunque aportan menor información sobre la especie detectada que si se emplean anticuerpos específicos como molécula de reconocimiento. No obstante, los péptidos antimicrobianos tienen una gran ventaja frente a los anticuerpos y es que son más resistentes a temperaturas elevadas, a la desecación y a otras condiciones ambientales desfavorables.

La polimixina B (PmB) es una sustancia que posee un amplio rango de acción frente a los microorganismos gram negativos y su coste es asequible. En cuanto a su capacidad de reconocimiento, se ha demostrado que la polimixina B tiene una afinidad mayor para *Escherichia coli* que cualquiera otro péptido antimicrobiano (Kulagina et al., 2006).

La polimixina B (Figura 2) es un antibiótico polipeptídico anfipático cíclico que contiene grupos amino libres derivados de α,γ -ácido diaminobutírico y una cola de ácidos grasos (Chattopadhyay et al., 2002). La polimixina se obtiene mediante el aislamiento a partir de la fermentación del microorganismo *Bacillus polymyxa*. El producto utilizado en este trabajo es el sulfato de polimixina B que contiene una mezcla variable de B₁ y B₂, aunque es predominante la B₁. Este producto posee un alto poder catiónico.

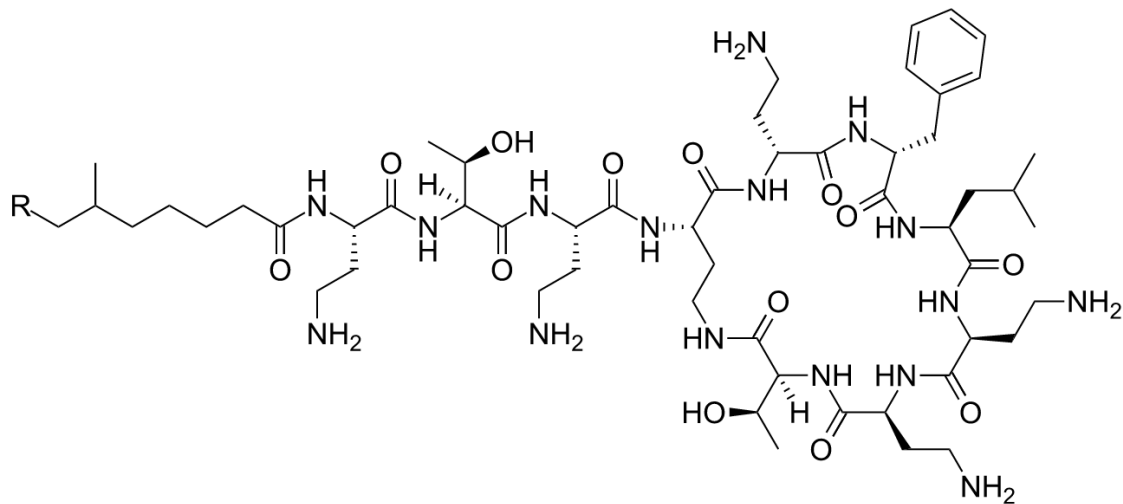


Figura 2. Estructura química de Polimixina B₁.

La polimixina tiene un mecanismo de acción antibiótica basado en la unión con los fosfolípidos de la membrana citoplasmática alterando de esta manera la permeabilidad normal de la membrana a moléculas de bajo peso molecular e induciendo la formación de poros en la pared bacteriana lo suficientemente grandes para que se produzca un flujo de nucleótidos al exterior de la célula.

Por otro lado, este antibiótico, por medio de sus grupos amino, es capaz de unirse a grupos fosfato del disacárido D-glucosamina y a grupos carboxilo presentes en el lípido A y en la región core de los lipopolisacáridos, con una interacción por fuerzas iónicas. Además, también se une a estas regiones por medio de interacciones hidrofóbicas entre los respectivos grupos acilo (Appelmelk et al., 1992). Esta interacción con LPS provoca una desestabilización estructural de la membrana impidiendo el crecimiento y la multiplicación de la bacteria y disminuye la acción tóxica del lípido A.

El rango de acción de polimixina B incluye a la mayoría de especies gram-negativas, siendo *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* algunos ejemplos de los microorganismos más susceptibles a su acción, si bien por ejemplo, la eficacia de la polimixina "in vivo" con *Pseudomonas aeruginosa* se ve ampliamente afectada por la presencia de iones divalentes. Sin embargo hay una serie de microorganismos que presentan resistencia a este antibiótico, como son *Proteus spp.*, *Neisseria spp.*, la mayoría de hongos y bacterias gram positivas.

El uso conjunto de algunas sustancias con la polimixina también provoca una inhibición de su acción. Algunos ejemplos de estas sustancias son cationes de hierro (II), cobalto (II), manganeso (II), agentes microbianos: anfotericina, clorhidrato de tetraciclina, cloranfenicol sódico, etc. De esta manera se deduce que algunas especies catiónicas presentes dificultan o inhibe la acción bactericida, y en el caso de los iones divalentes, éstos interaccionan con la polimixina B anulando completamente su acción.

La polimixina B es utilizada en farmacología para el tratamiento de infecciones provocadas por varios microorganismos y suele ser administrada junto con otros antibióticos (ej. neomicina) o con antiinflamatorios (ej. hidrocortisona). Su uso más corriente es por vía oftálmica, tópica u

ótica. Sirve para el tratamiento de diversos diagnósticos como conjuntivitis aguda crónica, úlceras de córnea, keratitis, etc. También es utilizada en cirugía oftálmica o en caso de lesiones graves en los ojos (Chattopadhyay et al., 2002). El microorganismo diana en los tratamientos oftálmicos con polimixina suele ser *Pseudomonas aeruginosa*. Existen muchos productos comercializados en forma de pomada, colirio o gotas óticas que contienen polimixina B.

En el caso de infecciones localizadas como la cistitis, la polimixina B se administra de forma local, y también se comercializan en formato de óvulo para tratar infecciones vaginales.

Otros mecanismos de administración son por vía intramuscular (la cual causa un gran dolor al paciente) y por vía intravenosa. Por estas vías de entrada, aproximadamente la mitad de la cantidad de polimixina subministrada se fija reversiblemente a las membranas de las células de corazón, riñones, hígado y otros tejidos, presentando nefrotoxicidad y neurotoxicidad (si se administra después de la anestesia puede ocasionar parálisis respiratoria). No se une de manera destacable a las proteínas plasmáticas, pero debido a la presencia de iones divalentes en el plasma sanguíneo su actividad se ve reducida en aproximadamente un 50%. La eficacia de este tratamiento se ve muy reducida por estas opciones de administración, por lo que apenas se utilizan (IQB-ANMAT-Argentina, 2015).

Este antibiótico no puede ser eliminado por hemodiálisis, pero tiene una gran aplicación en el tratamiento de septicemia, ya que la polimixina inmovilizada es utilizada para realizar una diálisis sanguínea con la finalidad de eliminar los lipopolisacáridos presentes en el plasma.

1.2.2. Lipopolisacárido (LPS)

Los lipopolisacáridos de *Escherichia coli* están formados por tres estructuras diferentes (Figura 3). La estructura más interna es el lípido A. Este se encuentra inmerso en la membrana externa del microorganismo (por encima de la capa de peptidoglucano) y le confiere al mismo las propiedades patológicas propias de las endotoxinas. Esta estructura está formada por un disacárido de D-glucosamina (los monómeros están unidos por el enlace β 1-6) unido a dos grupos fosfato (uno en el extremo 1 y otro en el extremo 4'). El disacárido presenta un enlace acilo tipo amida en las posiciones 2 y 2' con dos cadenas de ácido β -hidroximirístico (3-OH-14:0) y en las posiciones 3 y 3' está esterificado también por dos cadenas de ácido β -hidroximirístico. (Rojas, 1995) Dos de las cuatro cadenas del ácido graso nombrado anteriormente están esterificadas en el grupo hidroxilo con una cadena de ácido láurico (12:0) y con otra de ácido mirístico (14:0). El lípido A (parte inferior de la Figura 3) presenta un total de 6 cadenas de ácidos grasos y tiene un peso molecular aproximado de 1700 g/mol. Esta estructura apenas presenta modificaciones dentro de los individuos de una misma familia, pero sí que hay diferencias sustanciales entre los individuos de distintas familias (“Antígenos membranales Bacterias Gram positivas,” n.d.).

La estructura intermedia es la denominada oligosacárido nuclear o core y a su vez se puede dividir en el núcleo interno y núcleo externo. El core interno está formado azúcares únicos que son característicos de LPS, estos azúcares son el ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico (Kdo) y L-glicero-D-manoheptosa (Hep). Esta parte del núcleo se encuentra presente en todos los lipopolisacáridos y tiene muy poca variabilidad dentro de un mismo género, sin embargo sí que presenta muchas diferencias entre individuos de distintos géneros. El núcleo interno en

enterobacterias está formado por dos unidades de Kdo (3-desoxi-D-manno-Octulosonate) y dos de heptosa. También están presentes varios sustituyentes como pirofosforiletanolamina, confiriéndole heterogeneidad. El core externo está compuesto por hexosas (fundamentalmente por glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina). Los miembros de la familia de las enterobacterias presentan una elevada diversidad estructural en esta región (*Escherichia* posee cinco tipos diferentes de núcleo externo) sin embargo en otros microorganismos no entéricos lo más habitual es que esta región del núcleo no esté presente.

La estructura externa se llama polisacárido O. Está formado por cadenas de azúcares hidrofílicos unidas al núcleo externo y se proyectan al exterior de la célula. Estas cadenas están constituidas por una secuencia repetida de unidades de 1 a 6 azúcares, en algunas bacterias hay ramificaciones. El tipo de azúcar y el número de unidades que constituyen una unidad de secuencia es característico de cada serotipo, sin embargo en un mismo microorganismo la longitud de la cadena varía desde 0 a 40 unidades de secuencia (aunque algunos autores afirman que si la cepa es capaz de sintetizar la cadena el número mínimo de monómeros es 4, como se muestra en la Figura 3) (Kdo-containing & O-antigen, n.d.).

Aunque las cadenas O de dos microorganismos de distinto serotipo se parezcan mucho en lo que respecta a la estructura química, los efectos inmunológicos que provocan los dos microorganismos pueden ser completamente diferentes debido a las pequeñas diferencias estructurales. Además las cadenas pueden modificarse por la acción de un bacteriófago, esto puede significar que la gran diversidad de cadenas de polisacárido O presentes en la naturaleza deriva de un proceso de evolución (al menos en las especies endosimbióticas) en las que el microorganismo ha desarrollado dicha cadena para escapar del sistema inmune del huésped. Cuanto mayor sea la cantidad de cadenas y mayor longitud tengan, más resistente es la bacteria a antibióticos hidrofóbicos, detergentes y a algunos colorantes.

Las especies silvestres de *E. coli* pueden formar colonias morfológicamente diferentes dependiendo de su éxito al sintetizar el polisacárido O. Las colonias que lo sintetizan completo (existiendo siempre las variaciones internas en la repetición de la estructura básica) tienen un aspecto liso, en cambio, las bacterias

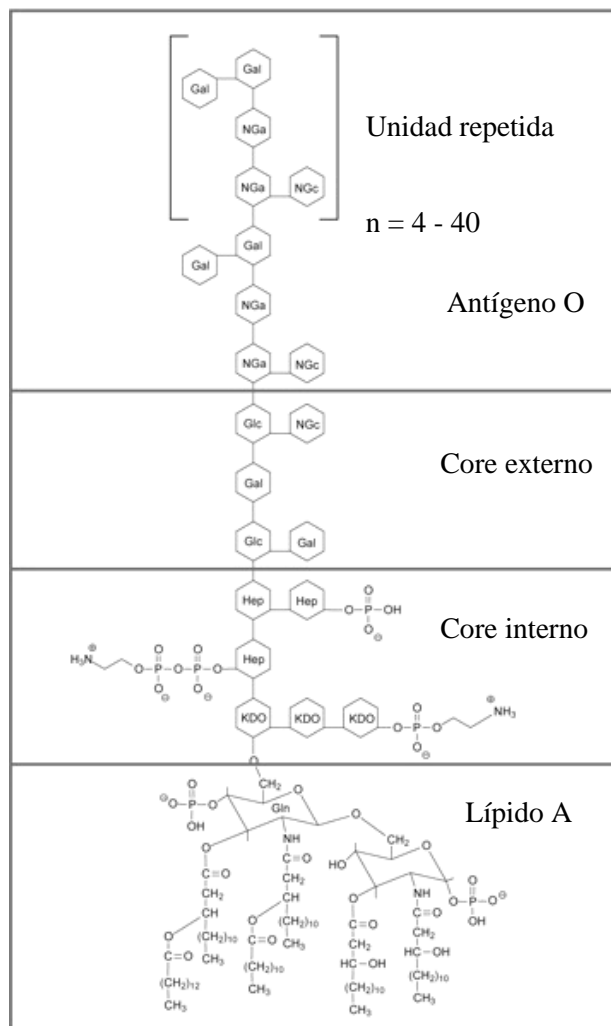


Figura 3. Lipopolisacárido completo de *Escherichia coli*.

que han sufrido alguna mutación y sintetizan las estructuras externas defectuosas o no las sintetizan tienen un aspecto rugoso. Estas últimas bacterias tienen mayores problemas de supervivencia debido a la vulnerabilidad a los factores ambientales descritos anteriormente.

En resumen, el lípido A le confiere a la bacteria la endotoxina y además juega un papel muy importante en la estructura de la membrana externa, sin embargo las bacterias son capaces de expulsar estas moléculas al medio. En las muestras extraídas a partir de bacterias, el lípido A no contiene una sola especie molecular con estructura química definida sino que son mezclas complejas de moléculas que difieren principalmente en el grado de acilación y se ha demostrado que su efecto para provocar la respuesta inmune se incrementa cuando forman micelas (Mueller et al., 2004).

El núcleo interno también tiene un papel estructural muy importante y en todas las bacterias gram-negativas hay como mínimo un residuo de Kdo o un derivado. Estas dos estructuras (lípido A y núcleo interno) son necesarias para el crecimiento y multiplicación de la bacteria y cubren un 75% de la superficie de la membrana externa de la *Escherichia coli*, lo que se puede cuantificar aproximadamente en 2 millones de moléculas por célula. Esto quiere decir que independientemente de la presencia de las estructuras exteriores, la endotoxina siempre está presente en la célula.

1.3. Tecnología de disco compacto

En los últimos años se ha hecho patente la necesidad de metodologías analíticas de alta sensibilidad, especificidad y rapidez. Por ello, el grupo de investigación SYM del Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universitat Politècnica de València viene trabajando en el desarrollo de metodologías aplicadas a las ciencias de la vida.

La metodología puesta a punto utiliza como plataforma de análisis un disco compacto y como sistema detector un lector/grabador de discos. La metodología analítica emplea un formato de micromatriz, de puntos donde se minimiza el gasto de reactivos y se reduce el tiempo del ensayo.

La plataforma de análisis puede ser un CD, DVD o Blu-ray comercial, por lo que los costes en material se reducen (coste aproximado 0,20 €/disco). Las tres plataformas presentan características comunes como el diámetro de 12 cm y el grosor de 1,2 mm. Estas dimensiones permiten tener una superficie de ensayo de 94 cm², que combinado con la técnica de la microimpresión, permiten desarrollar un gran número de ensayos simultáneos.

En este trabajo se van a emplear discos DVDs regrabables. El disco compacto DVD tiene dos capas de policarbonato de 0,6 mm de grosor cada una que actúan como material protector y entre las dos capas tiene una película metálica de aluminio de un grosor del orden de 100 Å. Los discos presentan ventajas, entre las cuales cabe destacar las características hidrofóbicas del policarbonato. Además la lámina metálica está protegida una resina de laca, un material de gran resistencia al impacto y excelente estabilidad a altas temperaturas. Gracias a las cualidades ópticas de los soportes y a su facilidad para ser derivatizados, es posible manipularse para crear dispositivos portátiles. Todos estos soportes en cualquiera de sus formatos han demostrado su

eficacia para la inmovilización covalente o por adsorción pasiva de biomoléculas que constituyen la base de un ensayo bioanalítico (Morais et al., 2007).

Por otra parte, el lector de DVD utiliza un láser rojo que emite luz monocromática a una longitud de onda de 650 nm (Hernández, 2013). Los lectores comerciales de los discos compactos (Figura 4) son unos equipos muy sofisticados y complejos, y fabricados en masa por lo que su precio es muy asequible (entre 50 y 300 €), en comparación con otros detectores de micromatrices, que tienen un coste entre 30.000 y 60.000 €. Además otra diferencia sustancial es que los escáneres convencionales de micromatrices tienen un área máxima de lectura de 18,75 cm² mientras que los lectores comerciales de DVDs escanean una superficie de 90 cm².



Figura 4. Prototipo de lector utilizado en los ensayos.

El principio de lectura de los grabadores de discos compactos tipo DVD se basa en registrar la intensidad de luz reflejada por la capa metálica cuando el láser de 650 nm incide sobre ella. Ésta es detectada por un fotodiodo del cabezal de lectura del grabador. Así, cualquier artefacto (producto de una reacción química, bioquímica o molecular) que altere las propiedades ópticas del disco, modificará la intensidad de luz reflejada, atenuando la señal que es detectada por el fotodiodo. Esta atenuación de la señal reflejada se relaciona directamente con la concentración de analito, causante de la alteración de las propiedades ópticas del disco (Morais et al., 2007) (Morais et al., 2008).

En este trabajo se emplea la tecnología de disco compacto para el desarrollo de microinmunoensayos para la detección de endotoxinas.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es desarrollar un sistema analítico basado en microinmunoensayos para la determinación cuantitativa de lipopolisacáridos procedentes de microorganismos gram-negativos, utilizando como sistema modelo la determinación de endotoxinas (LPS) de *E.coli* O26.

La consecución del objetivo conlleva el planteamiento de los siguientes objetivos parciales:

- Optimización de variables (composición y pH del tampón de impresión, concentración de anticuerpo detector, tiempo del ensayo, etc.) que influyen en la sensibilidad y selectividad analítica del inmunoensayo para la cuantificación de LPS.
- Marcaje del anticuerpo detector con oro coloidal con el fin de reducir el número de etapas del ensayo, manteniendo su sensibilidad.
- Análisis de muestras de microorganismos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Los reactivos empleados en el trabajo han sido los siguientes:

Anticuerpo policlonal de conejo específico de *E. coli* O26 (pAb O26) (1 mg/mL), anticuerpo policlonal de conejo para el género *Campylobacter* (pAb Cp) (2 mg/mL), anticuerpo policlonal de conejo para el género *Campylobacter* conjugado con HRP (2 mg/mL), lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* O26 (2,5 mg/mL), disolución de oro coloidal de 50 nm, polimixina B (PmB) (50 mg/mL), anticuerpo policlonal anti-conejo marcado con partículas de oro coloidal de 5 nm (GAR-Au o secundario) (4,0 mL), anticuerpo policlonal anti-conejo marcado con HRP (GAR-HRP), reactivo TMB (para el revelado del GAR-HRP), Tween 20, uso de agua destilada autoclavada para realizar la suspensión de los reactivos liofilizados, albúmina de suero bovino (BSA), trizma base, disolución de revelado de plata compuesta por disolución A (sal de plata) y disolución B (agente reductor).

Los anticuerpos específicos de *E. coli* han sido proporcionados por Abraxis (Warminster, PA), el resto de reactivos son de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

3.1.1. Tampones

Tampón de impresión: tampón carbonato/bicarbonato (CB) (50 mM, pH 9,6).

Tampón de trabajo y de lavado: tampón fosfato salino (PBS) 1X (obtenido a partir de una disolución de tampón fosfato salino 10X pH 7,4), con 0.05% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) (pH 7,4).

Tampones empleados en la optimización de la impresión de receptores: tampón carbonato (50 mM, pH 9,6), tampón fosfato salino (PBS) 1X (pH 7,4).

Tampones para marcaje de anticuerpo de *E. coli* O26 con partículas de oro coloidal de 50 nm: Tris Buffer (TB) (0,1 M, pH 8,5), TB (20 mM, pH 8,5), BSA al 10% (p/v) en TB (0,1 M, pH 8,5), BSA al 1% (p/v) en TB (20 mM, pH 8,5).

3.2. Cultivos

Las cepas utilizadas fueron proporcionadas por el Área de Microbiología del departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València y fueron: *Escherichia coli* CECT 101, *Escherichia coli* CECT 515, *Escherichia coli* CECT 4558, *Pseudomonas fluorescens* CECT 278, *Citrobacter freundii* CECT 401, *Micrococcus luteus* CECT 245, *Bacillus cereus* CECT 40, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

3.3. Equipos

Equipo de microimpresión (BIODOT modelo AD1500, BioDot, INC., Irvine, CA) utilizado para dispensar los receptores sobre los discos en la etapa de tapizado en formato de micromatriz.

Lector de CD/DVD modificado y un software (desarrollado por el equipo de investigación) de tratamiento de imágenes y análisis de datos.

Espectrofotómetro NanoDrop 2000 utilizado para determinar la concentración de proteína en una disolución.

3.4. Material

DVDs regrabables, discos de policarbonato transparentes y placa de polipropileno de 384 pocillos.

3.5. Métodos

3.5.1. Conjugación con oro coloidal

El protocolo de conjugación de anticuerpos policlonales con partículas de oro coloidal de 50 nm es el siguiente:

1. Dispensar 5mL de oro coloidal de 50 nm (OD) en un vial de vidrio. Ajustar el pH a 8,5 con el tampón Tris (TB) (1 M, pH 8,5) añadiéndolo gota a gota.
2. Añadir en un eppendorf de 1,5 mL, 1,0 mL de oro coloidal y 25 μ L de una disolución conteniendo 2,5 μ g de anticuerpo en TB 20 mM, pH 8,5. Mantener en agitación magnética durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 100 μ L de BSA al 10% (p/v) en TB 0,1 M.
4. Incubar 30 minutos con agitación magnética a temperatura ambiente.
5. Dividir la disolución de oro coloidal en alícuotas (250 μ L/eppendorf) y centrifugar a 6.600 rpm durante 20 minutos.
6. Retirar el sobrenadante y resuspender en 250 μ L en TB (20 mM, pH 8,5).
7. Volver a centrifugar a 6.600 rpm durante 20 minutos.
8. Retirar el sobrenadante y volver a resuspender en 250 μ L en TB (20 mM, pH 8,5).
9. Centrifugar por última vez a 6.600 rpm durante 20 minutos.
10. Retirar el sobrenadante, agrupar los precipitados y resuspender en 100 μ L de BSA al 1% (p/v) en TB (20 mM, pH 8,5).

3.5.2. Microinmunoensayos

El disco se ha segmentado en 20 zonas, cada una de ella constituida por una matriz de 16 puntos (4×4) separados 1 mm. El diseño del disco se muestra en la Figura 5. Cada matriz se emplea para realizar una determinación.

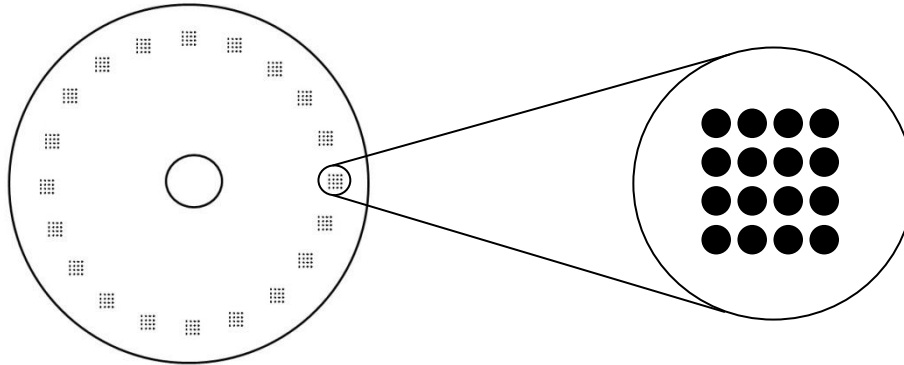


Figura 5. Diseño del disco segmentado en 20 matrices de 16 puntos.

3.5.2.1. Ensayo A

Es un inmunoensayo en formato micromatriz sobre DVD para la detección de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* O26 con tapizado de polimixina B y reconocimiento de LPS con anticuerpo policlonal específico además es necesario el uso del anticuerpo secundario GAR-Au/GAR-HRP. El esquema del ensayo se muestra en la Figura 6 y el protocolo es el siguiente:

1. Preparar la dilución de polimixina B a 25 mg/L (factor de dilución 1/2000) en CB y dispensar 80 μ L de esta dilución en una placa de 384 pocillos.
2. Utilizar el equipo BIODOT para dispensar 50 nL de la dilución anterior.
3. Incubar el disco impreso en estufa a 37°C durante una hora.
4. Lavar el disco con PBS-T, con agua destilada y secar.
5. Preparar diluciones seriadas decimales 0-20 ppm de LPS en PBS-T.
6. Dispensar 20 μ L de cada dilución en la matriz. Dejar reaccionar durante 30 minutos.
7. Lavar con PBS-T, agua destilada y secar.
8. Preparar una dilución de anticuerpo policlonal específico de *Escherichia coli* O26 a la concentración de 2,5 ppm.
9. Dispensar 20 μ L en cada matriz de la dilución anterior y dejar reaccionar durante 30 minutos.

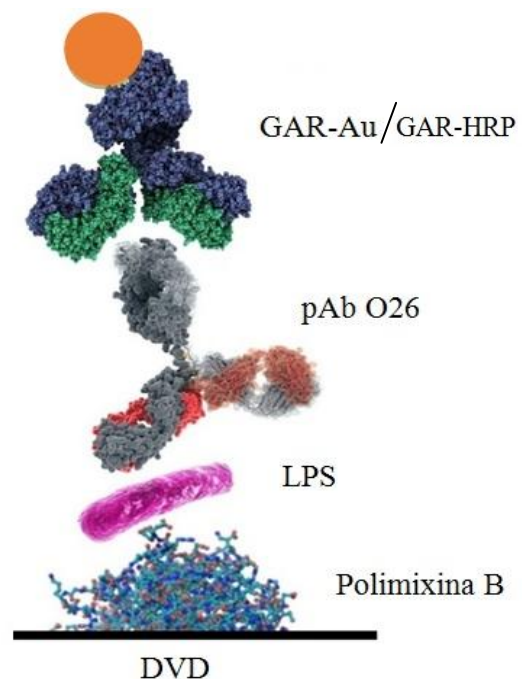


Figura 6. Esquema del ensayo A.

10. Preparar 1 mL de una dilución 1/100 de GAR-Au o GAR-HRP en dilución 1/250 en PBS-T. Dispensarlo de manera uniforme en el DVD empleando un disco de policarbonato transparente. Dejar reaccionar durante 30 minutos. Lavar con PBS-T, agua destilada y secar.
11. Dispensar 1,0 mL de la disolución de revelado de plata o TMB para el ensayo con GAR-Au o GAR-HRP, respectivamente.
12. Lavar el disco con agua destilada y secar.
13. Lectura del disco en el lector de CD/DVD modificado y análisis de datos.

3.5.2.2. Ensayo B

Es un inmunoensayo en formato micromatriz sobre DVD para la detección de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* O26 que emplea un tapizado de polimixina B y utiliza para el reconocimiento específico un anticuerpo policlonal conjugado con oro de 50 nm. El esquema del ensayo se muestra en la Figura 7 y el protocolo es el siguiente:

1. Preparar la dilución de polimixina B (factor de dilución 1/2000) en el tampón de impresión carbonato y dispensar 80 μ L de esta dilución en una placa de 384 pocillos.
2. Utilizar el equipo BIODOT para dispensar 50 nL de la dilución anterior.
3. Incubar el disco impreso en estufa a 37°C durante una hora.
4. Lavar el disco con PBS-T, agua destilada y secar en el rotor.
5. Preparar diluciones seriadas decimales 0-20 ppm de LPS en PBS-T.
6. Dispensar 20 μ L de cada dilución en la matriz. Dejar reaccionar durante 30 minutos.
7. Lavar con PBS-T, agua destilada y secar.
8. Preparar una dilución de la disolución de anticuerpo policlonal específico de *E. coli* O26 conjugado con oro coloidal de 50 nm (dilución 1/5).
9. Dispensar 20 μ L en cada matriz de la dilución anterior y dejar reaccionar durante 30 minutos.
10. Lavar con PBS-T, agua destilada y secar en el rotor.
11. Dispensar 1,0 mL de la disolución de revelado de plata. Distribuirlo uniformemente por el DVD, cubriéndolo con un disco transparente de policarbonato. Dejar reaccionar durante 8 minutos.
12. Lavar el disco con agua destilada y secar.
13. Lectura del disco en el lector de CD/DVD modificado y análisis de datos.

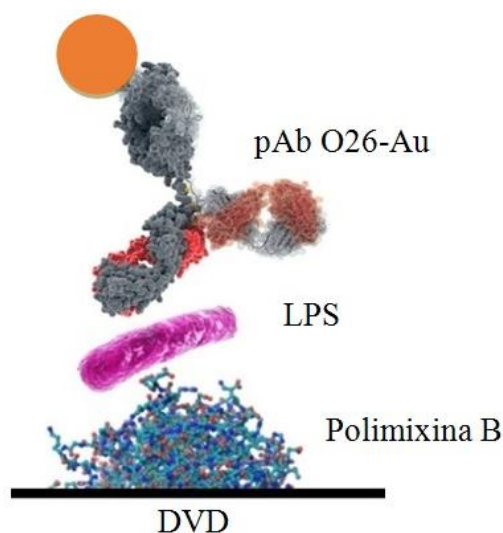


Figura 7. Esquema del ensayo B.

3.5.2.3. Ensayo C

Es un inmunoensayo en formato micromatriz sobre DVD para la detección de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* O26 utilizando un tapizado de anticuerpo policlonal y llevando a cabo el reconocimiento específico con anticuerpo policlonal conjugado con oro de 50 nm (formato sándwich). El esquema del ensayo se muestra en la Figura 8 y el protocolo es el siguiente:

1. Preparar la dilución de anticuerpo policlonal de *E. coli* de concentración 50 ppm en el tampón de impresión carbonato y dispensar 80 μ L de esta dilución en una placa de 384 pocillos.
2. Utilizar el equipo BIODOT para dispensar 50 nL de la dilución anterior.
3. Incubar el disco impreso en estufa a 37°C durante una hora.
4. Lavar el disco con PBS-T, agua destilada y secar.
5. Preparar diluciones seriadas decimales 0-20 ppm de LPS en PBS-T.
6. Dispensar 20 μ L de cada dilución en la matriz. Dejar reaccionar durante 30 minutos.
7. Lavar con PBS-T, agua destilada y secar.
8. Preparar una dilución de la disolución de anticuerpo policlonal específico de *E. coli* O26 conjugado con oro coloidal de 50 nm (dilución 1/5).
9. Dispensar 20 μ L en cada matriz de la dilución anterior y dejar reaccionar durante 30 minutos.
10. Lavar con PBS-T, agua destilada y secar.
11. Dispensar 1,0 mL de la disolución de revelado de plata. Distribuirlo uniformemente por el DVD, cubriéndolo con un disco transparente de policarbonato. Dejar reaccionar durante 8 minutos.
12. Lavar el disco con agua destilada y secar.
13. Lectura del disco en el lector de CD/DVD modificado y análisis de datos.

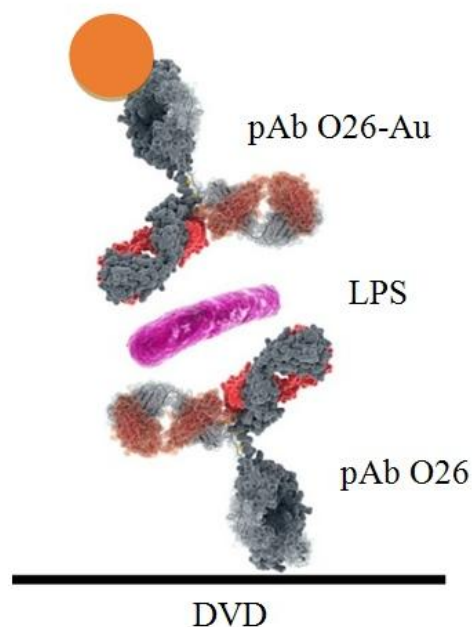


Figura 8. Esquema del ensayo C.

3.5.2.4. Ensayo D

Se trata de un inmunoensayo en formato micromatriz sobre DVD para la detección de *Campylobacter jejuni*. El ensayo emplea un tapizado de anticuerpo policlonal de *Campylobacter* llevando a cabo el reconocimiento específico con anticuerpo policlonal de *Campylobacter* conjugado con HRP/Au (formato sándwich). El esquema del ensayo se muestra en la Figura 9 y el protocolo es el siguiente:

1. Preparar la dilución de anticuerpo policlonal de *Campylobacter* a concentración de 40 mg/L en tampón de impresión CB y dispensar 80 µL de esta dilución en una placa de 384 pocillos.
2. Utilizar el equipo BIODOT para dispensar 50 nL de la dilución anterior.
3. Incubar el disco impreso en estufa a 37°C durante una hora.
4. Lavar el disco con PBS-T, agua destilada y secar en el rotor.
5. Preparar diluciones seriadas decimales de *C. jejuni* vivo en PBS-T de 10²-10⁵ u.f.c/mL. En el caso de la detección de *C. jejuni* lisado, introducir 250 µL de cultivo puro de 10⁵ u.f.c/mL en un eppendorf de 1,5 mL y calentarlo en baño termostataado a 80°C durante 15 minutos. Hacer diluciones seriadas decimales en PBS-T de 10²-10⁵ u.f.c/mL a partir del cultivo lisado.
6. Preparar los controles negativos constituidos por los siguientes microorganismos vivos a una dilución 10⁵ u.f.c/mL:
 7. *Escherichia coli* CECT 101.
 8. *Escherichia coli* CECT 515.
 9. *Escherichia coli* CECT 4558.
 10. *Pseudomonas fluorescens* CECT 278.
 11. *Citrobacter freundii* CECT 401.
 12. *Micrococcus luteus* CECT 245.
 13. *Bacillus cereus* CECT 40.
14. Preparar los controles positivos constituidos por *C. coli* vivo y lisado por calor a la concentración de 10⁵ u.f.c/mL como se describe en el punto 5.
15. Dispensar 20 µL de cada dilución en la matriz. Dejar reaccionar durante 30 minutos.
16. Lavar con PBS-T, agua destilada y secar.
17. Preparar una dilución 1/250 (8 mg/L) de la disolución de anticuerpo policlonal de amplio espectro para *Campylobacter* conjugado con HRP. En caso de utilizar el método de amplificación con plata, utilizar el anticuerpo marcado con oro de 50 nm a una dilución 1/100 en PBS-T.
18. Dispensar 20 µL en cada matriz de la dilución anterior y dejar reaccionar durante 30 minutos.
19. Lavar con PBS-T, agua destilada y secar.
20. Dispensar 1,0 mL de la disolución de TMB. Distribuirlo uniformemente por el DVD, cubriéndolo con un disco transparente de policarbonato. Dejar reaccionar durante 8 minutos. Si se ha empleado el anticuerpo marcado con oro coloidal, utilizar el reactivo de plata.
21. Lavar el disco con agua destilada y secar.
22. Lectura del disco en el lector de CD/DVD modificado y análisis de datos.

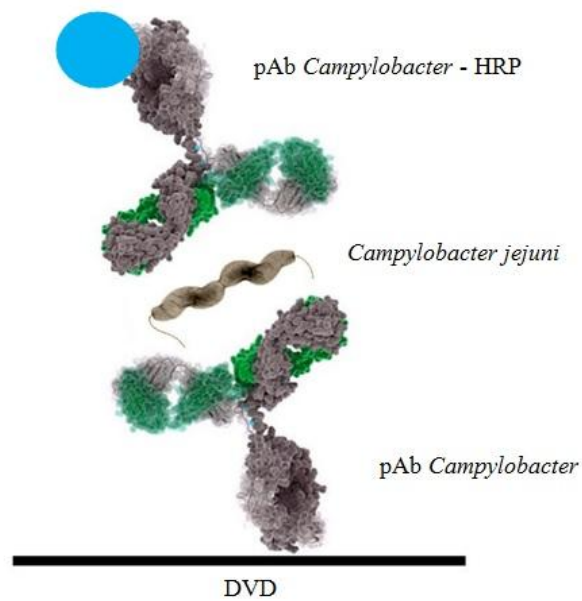


Figura 9. Esquema del ensayo D.

3.5.3. Recuentos de microorganismos

El recuento de microorganismos se realizó mediante técnicas tradicionales de microbiología con el fin de conocer el número de microorganismos presentes en la muestra de ensayo. El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Sembrar en superficie todas las diluciones de microorganismos en placas con agar Plate Count. Para ello se dispensa 0,1 mL de cada dilución en cada placa y se distribuye homogéneamente con un asa de Digralski.
2. Incubar en estufa a 37°C durante 24 horas.
3. Seleccionar aquellas placas que tengan entre 15 y 300 colonias de cada cultivo, contar las colonias exactas que hay y calcular el número medio de colonias que hay para un microorganismo.
4. Realizar los cálculos teniendo en consideración la dilución a la que se ha llevado a cabo el recuento y la dispensación de 0,1 mL a la hora de sembrar en placa. Obtener el resultado en unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por mililitro.

4. RESULTADOS

Los distintos ensayos han requerido un estudio de optimización de todas las variables implicadas en el proceso. En los siguientes apartados se muestran las diferentes variables evaluadas, utilizando el ensayo A como ensayo modelo para llevar a cabo la optimización de la mayoría de las variables. Los criterios de evaluación están basados en la comparación de la señal máxima obtenida, reproducibilidad medida como desviación estándar relativa media (RSD) y la sensibilidad del ensayo tomada como EC_{50} . En su defecto, se realizan medidas cualitativas de los resultados.

4.1. Ensayo A

En primer lugar se llevó a cabo la evaluación del efecto del tampón de impresión en la señal del ensayo. Para ello, se prepararon diferentes concentraciones de PmB (0-250 mg/L) en PBS, pH 7,4 y CB 50 mM, pH 9,6, y se imprimieron en el disco como se ha descrito en la sección de materiales y métodos. El ensayo se llevó a cabo en ausencia de LPS (blanco) y a una concentración de 20 mg/L. Los resultados se analizaron cualitativamente dado que la diferencia de la densidad óptica del producto de la reacción inmunológica era manifiestamente diferente al utilizar CB a PBS. Así, el empleo del tampón PBS, pH 7,4 generaba una señal débil para la concentración de 20 mg/L de LPS en todas las concentraciones de PmB estudiadas, mientras que los precipitados obtenidos utilizando tampón CB como medio de impresión fueron siempre elevados. Por ello, se seleccionó CB, 50 mM, pH 9,6 como tampón de impresión. El tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6 es habitualmente utilizado para la adsorción de proteínas en materiales poliméricos como es el caso del policarbonato del DVD. A su vez, se optimizó la concentración de polimixina B, estableciéndose que la concentración que proporcionaba mayor intensidad de señal sin reconocimiento inespecífico era 25 mg/L.

Otras variables del ensayo son la concentración de anticuerpo anti-O26, la dilución de anticuerpo detector marcado con oro y los tiempos de reacción de las diferentes etapas del ensayo. Dado la experiencia del grupo de investigación en la puesta a punto de microinmunoensayos en soportes tipo DVD, se consideró evaluar únicamente la concentración de anticuerpo anti-O26 a la hora de la puesta a punto del ensayo. Así pues, los ensayos se realizaron utilizando una dilución 1/100 de anticuerpo detector marcado con oro (GAR-Au) y los tiempos de incubación de las etapas de fijaron en 30 min para que todas las reacciones estuvieran en equilibrio.

En cuanto al anticuerpo anti-O26, se evaluó el efecto de la concentración (2,5; 5,0 y 10,0 mg/L) en la señal y sensibilidad del ensayo. El objetivo de la optimización de esta variable es hallar la mínima concentración de anticuerpo policlonal de *E. coli O26* que genere una señal máxima utilizando la menor cantidad de reactivo posible. Los ensayos se llevaron a cabo empleando una concentración de PmB, LPS y una dilución de anticuerpo detector de 25 mg/L, 20 mg/L y 1/100, respectivamente. Se observó que no había diferencias de señal entre las concentraciones estudiadas y se seleccionó 2,5 mg/L como concentración óptima por el menor consumo de reactivo empleando, manteniendo las prestaciones del ensayo en cuanto a señal máxima se refiere.

Finalmente, después del proceso de optimización, se obtuvo las siguientes curva de calibrado para los diferentes tipos de detección (Figuras 10 y 11):

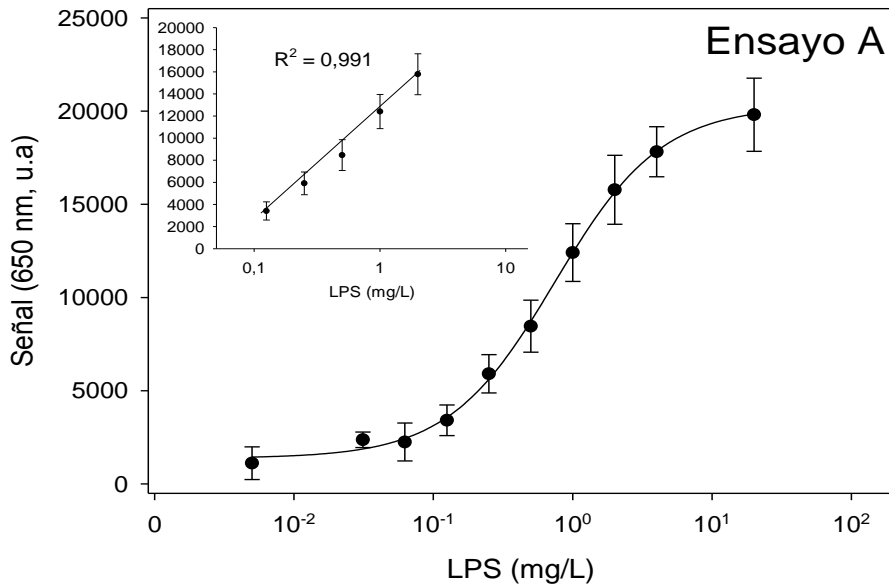


Figura 10. Curva del ensayo A empleando GAR-Au.

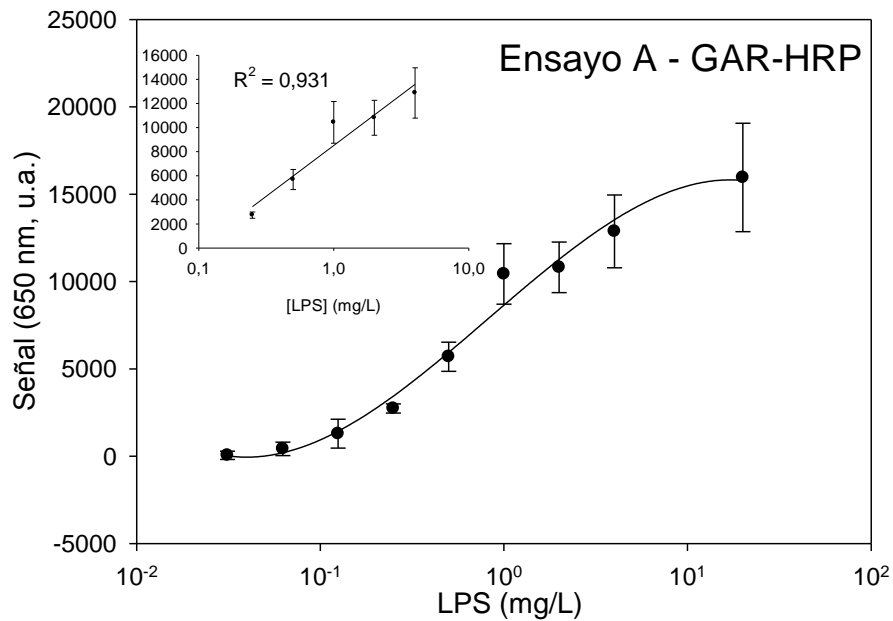


Figura 11. Curva del ensayo A empleando GAR-HRP.

La Figura 10 representa los datos obtenidos de un disco en el que se ha realizado el ensayo A utilizando GAR-Au. Se obtuvo una curva con una señal máxima de 20.000 u.a. y un EC_{50} de 0,6 mg/L. Esta sensibilidad está muy lejos de igualar a las de las técnicas basadas en LAL (aproximadamente 2,2 μ g/L, dependiendo de la técnica que se utilice) (Burguet & Brito, 2012), sin embargo la sensibilidad obtenida sí que se encuentra en el mismo orden de magnitud (mg/L)

que los ensayos ELISA y sus variantes (radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, etc.) (Hernández Calleja, 2001).

En referente al resto de parámetros analíticos, en este ensayo se obtuvo un límite de detección de 0,14 mg/L y un límite de cuantificación de 0,59 mg/L. El intervalo de trabajo situado entre el 20 y el 80% de la señal corresponde a 0,15-2,34 mg/L de LPS y la reproducibilidad es 20,31%.

En la Figura 11 se observa una curva obtenida de los datos del ensayo A empleando GAR-HRP. La señal máxima es 16.000 u.a. y el EC_{50} obtenido es 0,74 ppm. Tras comparar estos resultados con el ensayo anterior, la señal generada por el medio orgánico es más débil que la generada con el medio inorgánico. La sensibilidad obtenida con el empleo de GAR-Au es superior que con GAR-HRP. Como también se observa comprando las Figuras 10 y 11, el intervalo de trabajo posee mayor linealidad en la curva del GAR-Au. La reproducibilidad del ensayo con HRP es 30,60%, lo que supone una diferencia del 10% con el oro.

Por lo tanto, debido a una mayor sensibilidad, señal, reproducibilidad y linealidad en el intervalo de trabajo, el ensayo A con empleo de GAR-Au y revelado de plata es el que muestra mejores prestaciones.

El coste económico de los materiales y reactivos empleados en el ensayo A con GAR-Au es 2,64 € por disco, desglosado en: polimixina B: $4 \cdot 10^{-4}$ €, anticuerpo policlonal: 1,5 €, GAR-Au: 0,46 €, reactivo de plata (solución A y B): 0,48 € y DVDr: 0,2 €. El precio ha sido obtenido a partir de los costes de los reactivos utilizados durante los ensayos en función de la cantidad utilizada para cada ensayo, sin tener en cuenta el precio de los tampones ni el material.

4.2. Ensayo B

El ensayo B se llevó a cabo en las mismas condiciones establecidas para el ensayo A en lo que se refiere a tampón de impresión, concentración de polimixina B y tiempos de reacción. La diferencia más significativa entre los ensayos A y B es que este último utiliza como especie detectora el propio anticuerpo anti-O26 de *E. coli* marcado con oro. De este modo se simplifica el ensayo en cuanto a número de etapas se refiere.

El anticuerpo marcado con oro coloidal de 50 nm ha sido conjugado en el laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en la página 14 y se ha optimizado evaluando el efecto de la concentración (diluciones: 1/20, 1/10 y 1/5) en la señal y sensibilidad del ensayo. Los ensayos se llevaron a cabo empleando una concentración de PmB y LPS de 25 mg/L y 20 mg/L respectivamente. Se observó que la concentración que mejor señal proporcionaba era la dilución 1/5, por lo que se seleccionó como la dilución óptima. La Figura 12 representa la curva del ensayo obtenida en estas condiciones.

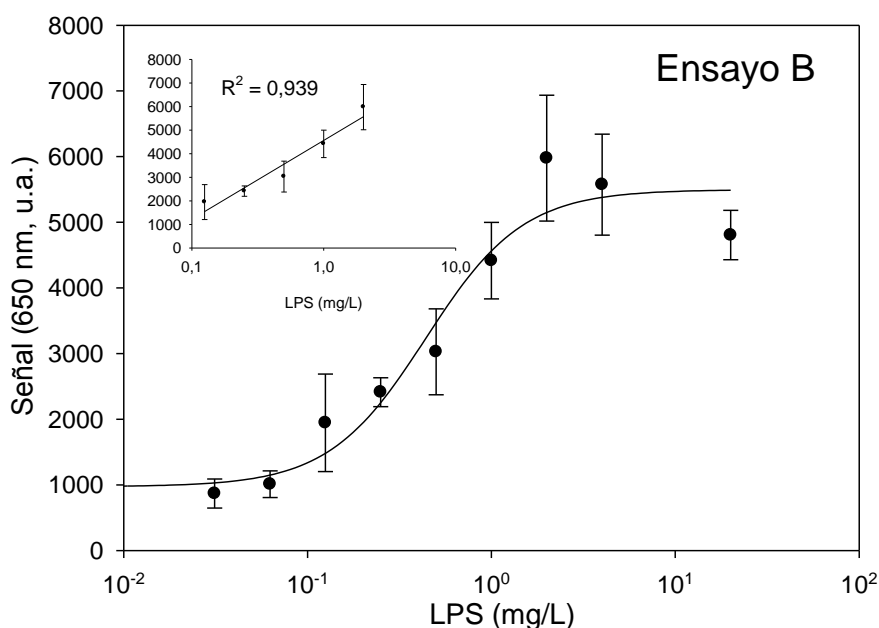


Figura 12. Curva del ensayo B.

La señal máxima es de 6.000 u.a. y el EC_{50} de 0,31 mg/L. El límite de detección es 0,10 mg/L y el límite de cuantificación 0,27 mg/L. El intervalo de trabajo es 0,27-1,19 mg/L y la reproducibilidad es 18,38%.

El coste económico de los materiales y reactivos es 3,22 € por disco, desglosado en: polimixina B: $4 \cdot 10^{-4}$ €, anticuerpo policlonal: 1,5 €, disolución de oro coloidal 50 nm: 1,04€, reactivo de plata (disolución A y B): 0,48 € y DVDr: 0,2 €. El precio ha sido obtenido a partir de los costes de los reactivos utilizados durante los ensayos en función de la cantidad utilizada para cada ensayo, sin tener en cuenta el precio de los tampones ni el material.

Comparando los ensayos A y B se observa que la sensibilidad entre los dos métodos se encuentra en el mismo orden de magnitud (0,31 mg/L en el ensayo B y 0,59 mg/L en el ensayo A). Sin embargo se aprecia una disminución de la señal entre el ensayo A (señal máxima 20.000 u.a.) y el B (señal máxima 6.000 u.a.) debido a que el tamaño de los coloides de oro empleados es de 50 nm y éstos tienen peor capacidad de amplificación porque la superficie en contacto con el reactivo de plata es menor que cuando se utilizan coloides de 5 nm, como los que tienen el GAR-Au, a esto es debido que la señal se vea disminuida (Dobosz et al., 2015).

El tiempo del ensayo B es treinta minutos menor debido a que no se realiza la etapa del anticuerpo secundario, el coste del ensayo B por disco es 58 céntimos de euro más caro que el ensayo A y la reproducibilidad de los dos ensayos es similar (20,31% en el ensayo A y 18,38% en el ensayo B). Sin embargo, la intensidad de la señal generada es una diferencia destacable entre los dos ensayos y en base a este parámetro se determina que el ensayo A es el que muestra mejores prestaciones.

4.3. Ensayo C

El ensayo C se llevó a cabo en las mismas condiciones establecidas para el ensayo A y B en lo que se refiere a tampón de impresión, concentración de anticuerpo anti-O26 de *E. coli* marcado con oro y tiempos de reacción. La diferencia más significativa con los ensayos anteriores es que el ensayo C utiliza como molécula de captura el propio anticuerpo anti-O26 de *E. coli* inmovilizado.

Para llevar a cabo la optimización del anticuerpo anti-O26 inmovilizado, se evaluó el efecto de la concentración (12,5; 25 y 50 mg/L) en la señal y sensibilidad del ensayo. Los ensayos se llevaron a cabo empleando una concentración de PmB y LPS de 25 mg/L y 20 mg/L respectivamente. Se observó que la concentración que mejor señal proporcionaba era 50 mg/L por lo que se seleccionó como la concentración óptima. La Figura 13 representa la curva del ensayo.

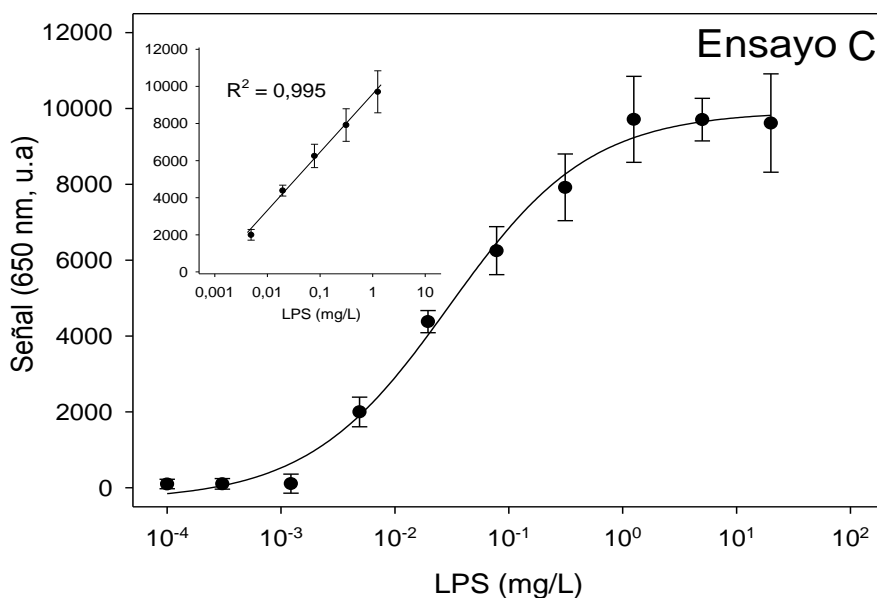


Figura 13. Curva del ensayo C.

La curva tiene una señal máxima de 10.000 u.a. y un EC₅₀ de 32,5 µg/L. Esta sensibilidad se encuentra en el mismo orden de magnitud de la sensibilidad de las técnicas LAL y supera la sensibilidad de todas las técnicas basadas en ELISA. En referente al resto de parámetros analíticos, se ha obtenido un límite de detección de 1,4 µg/L y un límite de cuantificación de 2,6 µg/L. El intervalo de trabajo es 3,9-274,2 µg/L de LPS y la reproducibilidad es 22,70%.

El coste económico de los materiales y reactivos es 4,42 € por disco, desglosado en: anticuerpo policlonal tapizado: 1,2 €, anticuerpo policlonal detector: 1,5 €, disolución de oro coloidal 50 nm: 1,04€, reactivo de plata (disolución A y B): 0,48 € y DVD: 0,2 €.

Como recapitulación se ha comparado el ensayo A con el ensayo C para determinar cuál de todos los ensayos propuestos ha tenido más éxito. El ensayo A tiene una señal máxima de

20.000 u.a., esto supone una diferencia del 50% en señal con el ensayo C, que tiene una señal máxima de 10.000 u.a. Además el ensayo A es 1,78 €/disco más barato.

Por otro lado el ensayo C tiene una sensibilidad 18 veces superior a la del ensayo A, el intervalo de trabajo abarca casi tres órdenes de magnitud (mientras que el del ensayo A abarca uno) y el tiempo de ensayo es 30 minutos menor. Por todo ello, se concluye que el ensayo C tiene mejores prestaciones analíticas que el ensayo A pese a la diferencia de señal y precio.

4.4. Ensayo D

Para concluir con este trabajo se ha puesto a prueba la eficacia del método para la determinación de microorganismos. Para ello se ha diseñado un último ensayo (D) que posee la estructura básica del mejor de los ensayos (C) y ha sido probado con cultivos de microorganismos.

El ensayo D se ha llevado a cabo en las mismas condiciones establecidas para el ensayo C en lo que se refiere a tampón de impresión, concentración de anticuerpo policlonal anti-*Campylobacter* inmovilizado, concentración de anticuerpo anti-*Campylobacter* marcado con oro y tiempos de reacción. La diferencia con el ensayo C es el uso del anticuerpo anti-*Campylobacter* en lugar del anticuerpo anti-*E. coli* O26.

El ensayo se ha realizado según el procedimiento descrito en la página 18. Los controles positivos y negativos tienen como finalidad determinar la selectividad que el anticuerpo policlonal de *Campylobacter* le proporciona al método.

Los resultados obtenidos ponen en manifiesto que en la determinación de microorganismos muertos, la eficacia del método es mucho mayor que en microorganismos vivos (en éstos último la señal generada no se distingue del ruido de fondo). Esto es debido probablemente a que los lipopolisacáridos se encuentran más disponibles para poder llevar a cabo el reconocimiento molecular con el anticuerpo, por la acción disgregadora del calor sobre la membrana celular. En base a esto a partir de ahora solo se evaluarán los resultados con los microorganismos muertos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el ensayo delatan una gran cantidad de ruido de fondo y solo la dilución más concentrada de microorganismos origina una señal diferenciada débilmente (datos no mostrados).

Para solventar este inconveniente, se ha realizado el ensayo D con generación de señal orgánica sustituyendo el anticuerpo conjugado con oro por anticuerpo policlonal de *Campylobacter* conjugado con HRP, y en lugar de emplear el reactivo de plata se utiliza TMB.

La curva obtenida está representada en la Figura 14. Como se observa, el ruido de fondo es prácticamente nulo y ello permite que las dos diluciones más concentradas de microorganismos tengan una señal diferenciada del blanco. Además se obtiene una recta de 3 puntos que permite obtener los siguientes parámetros: señal máxima de 7.552 u.a., EC₅₀ de 9.244 u.f.c./mL, LD de 1040 u.f.c./mL, LC de 1388 u.f.c./mL, RD de 2.065-41.373 u.f.c./mL y reproducibilidad de 11,62%.

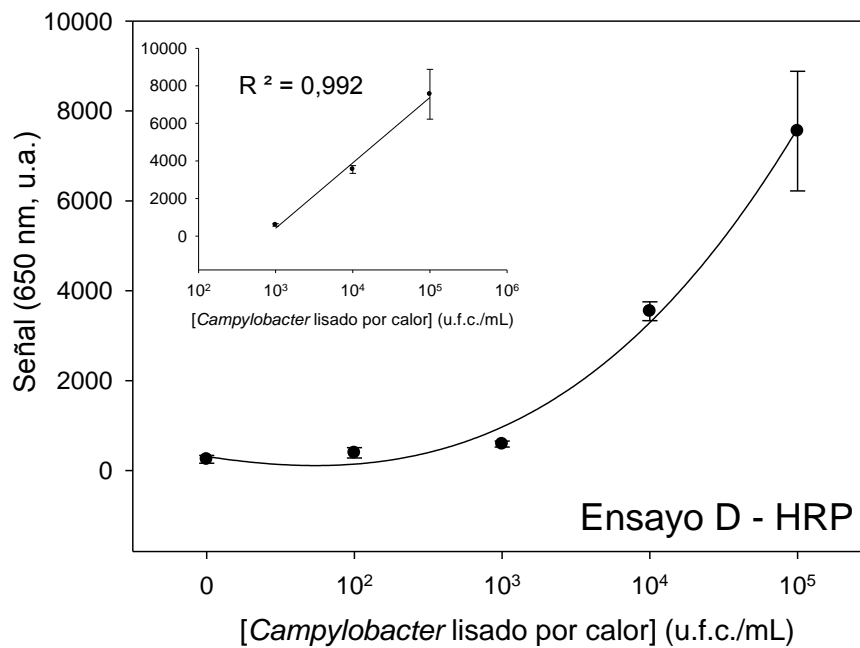


Figura 14: Curva del ensayo D empleando pAb-HRP.

Los resultados obtenidos reflejan la capacidad de los microinmunoensayos para detectar 1.000 u.f.c./mL. Teniendo en cuenta que se dispensan 20 μ L por matriz, se detecta 20 células por matriz, es decir, 1,25 células por punto. Este resultado manifiesta que el método es eficaz y con potencial implementarse como una herramienta útil en el sector agroalimentario para la determinación de microorganismos.

5. CONCLUSIONES

El microinmunoensayo en formato sándwich con anticuerpo inmovilizado muestra una mayor sensibilidad que los que emplean polimixina B como receptor, probablemente debido a la mayor afinidad del anticuerpo por los lipopolisacáridos.

El marcaje de anticuerpos con oro coloidal ha permitido desarrollar ensayos de menor número de etapas, manteniendo la sensibilidad y reproducibilidad.

En la determinación de microorganismos utilizando microinmunoensayos en formato sándwich, el tratamiento térmico previo a la realización del ensayo es clave para la detección de estos, debido a que la acción disgregadora por parte del calor sobre la membrana plasmática aumenta el reconocimiento específico a LPS.

Los sistemas desarrollados tienen aplicación en el sector agroalimentario debido a su sensibilidad, especificidad, portabilidad y bajo coste que permiten que puedan ser implementados como herramienta de análisis muy competitivas en la cadena de producción de alimentos. A su vez, en el ámbito clínico, los microinmunoensayos desarrollados constituyen un herramienta útil debido a su elevada sensibilidad y cortos tiempos de ensayo que permite detectar LPS a los niveles establecidos por las farmacopeas Europea y Americana (20-500 pg para inyección intravenosa y 215-2000 pg para los dispositivos médicos) (Thompson et al., 2014).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott División Diagnóstico. (1998). Introducción a los Inmunoensayos, *Manual Inm.*
- Antígenos membranales Bacterias Gram positivas. (n.d.). *Nature Reviews Microbiology.*
- Appelmelk, B. J., Marian, a, Thijs, B. G., & Maclaren, D. M. (1992). / *Dae* \, 316, 311–316.
- Biotrace, B. (1960). Equipo y Reactivos.
- Burguet, N., & Brito, L. C. (2012). Validación del método lal para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica sodium heparin. *VacciMonitor*, 21(3), 32–36.
- Chattopadhyay, D., River, C., & Zealand, N. (2002). K K, 17(3), 800917. Solicitud de patente, Patente número ES2079994. https://www.lens.org/lens/patent/ES_2079994_B1
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305. <http://doi.org/10.1157/13059826>
- De Oliveira Magalhães, P., Lopes, A. M., Mazzola, P. G., Rangel-Yagui, C., Penna, T. C. V., & Pessoa, A. (2007). Methods of endotoxin removal from biological preparations: A review. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10(3), 388–404.
- Dobosz, P., Morais, S., Puchades, R., & Maquieira, a. (2015). Nanogold bioconjugates for direct and sensitive multiplexed immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 69, 294–300. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.007>
- Hernández Calleja, A. (2001). NTP 611 : Agentes biológicos : análisis de las muestras. *Insht*, 1–12.
- Hernández, R. (2013). Diferencias entre CD, DVD y Blu-RAY. Visto el 3 de Junio del 2015, de from http://rodhzuniga.blogspot.com.es/2013_01_20_archive.html
- Herranz Sorribes, C. (2008). Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria (yII). Visto el 12 de Junio del 2015, de <http://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion/2008/02/08/84070>
- IQB-ANMAT-Argentina, E. de redacción de. (2015). Polimixina B. Visto el 16 de Junio del 2015, de <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/p037.htm>
- Kdo-containing, T., & O-antigen, T. (n.d.). Lipopolysaccharides Bacterial Components Lipopolysaccharides Functions and Applications, 27–29.
- Keller, K.-. (2011). Brote del síndrome urémico hemolítico de1 Origen de la epidemia alemana, 2–5.
- Kulagina, N. V., Shaffer, K. M., Anderson, G. P., Ligler, F. S., & Taitt, C. R. (2006). Antimicrobial peptide-based array for Escherichia coli and Salmonella screening. *Analytica Chimica Acta*, 575(1), 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.082>
- Morais, S., Carrascosa, J., Mira, D., Puchades, R., & Maquieira, Á. (2007). Microimmunoanalysis on standard compact discs to determine low abundant compounds. *Analytical Chemistry*, 79(20), 7628–7635. <http://doi.org/10.1021/ac070328b>
- Morais, S., Tamarit-López, J., Carrascosa, J., Puchades, R., & Maquieira, Á. (2008). Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(8), 2837–2844. <http://doi.org/10.1007/s00216-008-2224-4>

- Mueller, M., Lindner, B., Kusumoto, S., Fukase, K., Schromm, A. B., & Seydel, U. (2004). Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26307–26313. <http://doi.org/10.1074/jbc.M401231200>
- Rojas, N. (1995). El Lipopolisacarido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas, 71–84.
- Thompson, M., Blaszykowski, C., Sheikh, S., & Romaschin, A. (2014). A true theranostic approach to medicine: Towards tandem sensor detection and removal of endotoxin in blood. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 3–10. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.008>