



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 170 637**

②① Número de solicitud: 200000370

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: C12Q 1/04

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **17.02.2000**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2002**

Fecha de concesión: **21.11.2003**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.2004**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.01.2004**

⑦③ Titular/es: **Universidad De Granada  
Acera De San Ildefonso, 42  
Granada, ES**

⑦② Inventor/es: **Entrala Torres, Emilio;  
Molina Molina, Jose Manuel;  
Osuna Carrillo De Albornoz, Antonio y  
Mascaro Lazcano, Carmen**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Metodo y kit para la seleccion de formas de resistencia viables de parasitos enteropatogenos.**

⑤⑦ Resumen:

Método y kit para la selección de formas de resistencia viables de parásitos enteropatógenos. Consiste en el desarrollo de un método y kit para la aplicación del mismo, que permite la selección de quistes viables de protozoos y parásitos enteropatógenos a partir de muestras biológicas complejas, como muestras fecales, agua, lodos, fertilizantes orgánicos, tierra, alimentos o cualquier otra muestra que pueda contener quistes de dichos parásitos enteropatógenos. El método consiste en la separación de los componentes de la muestra en función de su densidad relativa en un gradiente de densidad hiperosmótico, compuesto por una sal disuelta en un tampón. La centrifugación de la muestra permite la migración de las partículas a través del gradiente, separándose sus componentes en función de su densidad relativa en dicho gradiente. Los organismos viables forman una banda que puede ser extraída para su caracterización o diagnóstico.

ES 2 170 637 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Método y kit para la selección de formas de resistencia viables de parásitos enteropatógenos.

## Objeto de la invención

Consiste en el desarrollo de un método y kit para la aplicación del mismo, que permite la selección de quistes viables de protozoos y parásitos enteropatógenos a partir de muestras biológicas complejas, como muestras fecales, agua, lodos, fertilizantes orgánicos, tierra, alimentos o cualquier otra muestra que pueda contener quistes de dichos parásitos enteropatógenos. Este método permite evaluar de forma rápida y sencilla el riesgo que conlleva la utilización o manipulación de material potencialmente contaminado.

## Antecedentes

La criptosporidiosis es una diarrea aguda, acuosa y explosiva, comparada en ocasiones a la colérica, provocada por especies del género *Cryptosporidium*, un protozoo perteneciente al Phylum Apicomplexa que afecta a vertebrados. Entendemos por "*Cryptosporidium*" a un género de protozoo coccidio parásito, que es enteropatógeno con un desarrollo autolimitante en individuos inmunocompetentes, pudiendo desencadenar diarreas persistentes en inmunocomprometidos, siendo potencialmente fatal. Los ooquistes son la fase infectiva del parásito, responsable de la transmisión de la enfermedad. Esféricos o ligeramente ovoides, presentan un diámetro que oscila entre las 4 y las 8 micras de diámetro, según especies. La infección se transmite mediante la ingestión de ooquistes, vehiculizados en ocasiones por agua o alimentos contaminados, o mediante contacto con hospedadores infectados. La principal especie responsable de la infección en mamíferos (incluido el ser humano) es *Cryptosporidium parvum*. De ciclo directo o monoxeno, posee algunas características que le convierten en una seria amenaza de salud pública: 1.- su manifiesta inespecificidad por el hospedador, que convierte a la mayoría de los mamíferos en potenciales reservorios de la enfermedad; 2.- su extrema resistencia a los desinfectantes, que le permite sobrevivir al proceso de potabilización mediante desinfección química o cloración del agua; y 3.- su pequeño tamaño (4 micras de diámetro), que facilita su diseminación en el medio ambiente (especialmente vehiculizado mediante el agua), imposibilita su eliminación mediante filtración convencional, y dificulta su detección en mezclas biológicas complejas.

En adición, su baja dosis infectiva en humanos ( $DI_{50} = 132$  ooquistes; DuPont et al. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. New England Journal of Medicine 332:855-859.) facilita la aparición de brotes epidémicos asociados al consumo de agua potable o alimentos contaminados. El mayor brote asociado a consumo de agua potable contaminada tuvo lugar en Milwaukee en 1993, donde se estima que 403,000 personas fueron afectadas (MacKenzie et al. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. The New England Journal of Medicine 331: 161-167; MacKenzie et al. 1994. Massive outbreak of water-borne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. Clinical Infectious Diseases 21:57-62).

Las técnicas actualmente utilizadas para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en agua potable son complejas y caras. La técnica más aceptada incluye una filtración usando filtros capaces de retener partículas de diámetro superior a 1 micra, seguido de la recuperación del material retenido, y la concentración de los ooquistes gracias a la acción de partículas magnéticas recubiertas de un anticuerpo monoclonal frente al ooquiste (US Environmental Protection Agency, Método 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA; UK The Water Supply (Water Quality) (Amendment) Regulations 1999 SI n° 1524: *Cryptosporidium* in water supplies.). Entre los principales inconvenientes de esta técnica está la variable eficacia en la recuperación de ooquistes, dependiente de la experiencia del operador, e influenciada por la turbidez de la muestra. Las muestras con elevada turbidez no pueden ser procesadas de este modo, y por extensión, la técnica no es de aplicación para aguas residuales o cualquier otro medio con elevado número de partículas en suspensión. Otra de las principales limitaciones de esta técnica es que no permite determinar si los ooquistes detectados son viables (y en consecuencia potencialmente peligrosos para la salud pública) o inocuos. La detección de ooquistes en muestras que son por su naturaleza susceptibles de contener contaminación por este parásito, como aguas residuales (aguas fecales de origen animal o humano), abonos orgánicos (estiércol), o cualquier otro material que pueda haber entrado en contacto con estos (industria agroalimentaria), no permite discernir si son realmente peligrosos para la salud pública o por el contrario son aptas para su uso.

La evaluación de la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* se realiza fundamentalmente utilizando como criterios la inclusión/exclusión de colorantes vitales y el desenquistamiento *in vitro* (Campbell AT, Robertson LJ and Smith HV. 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of

in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3488-3493), así como la infectividad en animales de experimentación o cultivos *in vitro*. Si bien es reconocido que los criterios basados en la infectividad son más fiables, su estandarización y uso como técnica de rutina resultan difíciles debido a su elevados requerimientos técnicos y su elevado coste. Por otra parte, las técnicas basadas en la inclusión/exclusión de colorantes vitales, así como las basadas en el desenquistamiento in vitro del ooquiste, son extremadamente laboriosas y no permiten seleccionar o separar los ooquistes viables de los no viables. Además, requieren de técnicas complementarias de filtración/purificación que faciliten la observación del ooquiste aislado, y necesitan de personal altamente especializado para su realización e interpretación de los resultados obtenidos.

### Explicación de la invención

El método permite la selección de los ooquistes viables de *Cryptosporidium* spp. presentes en una muestra gracias a su aplicación a un gradiente de densidad formado con una solución con densidades comprendidas entre 1.00 y 1.40 g/ml. El gradiente puede configurarse lineal (gradiente continuo) o discontinuo. El método se basa en la flotación del ooquiste viable de *Cryptosporidium* en una solución hipertónica. Es igualmente aplicable a la purificación de microorganismos capaces de mantener una densidad constante en soluciones hipertónicas. La suspensión compleja a fraccionar (preferiblemente suspensiones fecales, sedimentos o filtrados procedente de agua de cualquier tipo, sedimentos de muestras biológicas, homogenados de tejidos biológicos, alimentos, etc.), se aplica a un gradiente de una solución con densidades comprendidas entre 1.00 y 1.40 g/ml. El gradiente es sometido a una fuerza de centrifugación capaz de desplazar las partículas a través del gradiente, obteniéndose el fraccionamiento de las partículas en función de su densidad aparente en un medio hiperosmótico. Preferiblemente deben aplicarse fuerzas de centrifugación que oscilan entre las 1,000 x g y 100,000 x g, y tiempos superiores a los 15 minutos.

La banda donde se localizan los ooquistes viables de *Cryptosporidium* puede ser retirada y lavada mediante diluciones sucesivas en el tampón deseado. La suspensión de partículas así obtenida puede ser analizada para la identificación de los mismos, empleando técnicas basadas en la visualización de estructuras quísticas, proteínas o ácidos nucleicos (ADN o ARN) características del enteropatógeno. La figura 1 muestra un diagrama esquemático del proceso.

### Descripción de la invención

La presente invención se dirige a su aplicación para la selección de formas quísticas viables de *Cryptosporidium*, su utilización como técnica de evaluación de viabilidad, así como para su aplicación como parte de un kit de diagnóstico. Asimismo es aplicable a cualquier microorganismo capaz de mantener una densidad constante en las condiciones de osmolaridad del gradiente.

La muestra a analizar (cualquier suspensión que pueda contener ooquistes viables o no de *Cryptosporidium*, o cualquier suspensión obtenida de material particulado por disgregación o lavado de la misma) es aplicada a un gradiente de densidad formado por la disolución de una sal en agua o una disolución tamponada formada mayoritariamente por agua. La solución tamponada se suministra en polvo (sobres monodosis A, conteniendo un tampón TRIS-EDTA), y ha de ser reconstituida mediante la adición del volumen de agua destilada (obtenida por destilación u ósmosis inversa, libre de enteropatógenos) indicado en las instrucciones. Esta solución A debe usarse para reconstituir las dos soluciones de sal (soluciones B y C), suministradas en sendos sobres monodosis (conteniendo las cantidades necesarias de bromuro potásico en polvo). El kit está compuesto por tanto por sobres monodosis de tres tipos, A, B y C, así como por tubos de centrifuga de plástico transparente (preferiblemente tipo Sterilin<sup>®</sup>, preferiblemente de 25 ml de capacidad), y pipetas (preferiblemente de plástico y de 10 ml de capacidad).

El gradiente se construye siguiendo las instrucciones suministradas, y se aplica la suspensión problema en la parte superior. A continuación se procede al fraccionamiento de la muestra mediante centrifugación, según las condiciones que el operador ha de establecer en base a la centrífuga disponible y los requerimientos especificados en las instrucciones. Se utilizan para ello rotores fijos o de balanceo (según especificado en las instrucciones), debiéndose aplicar una fuerza gravitacional suficiente para el desplazamiento de la muestra a través del gradiente, consiguiendo de esta forma el fraccionamiento de la muestra en función de su densidad aparente en un medio hiperosmótico. El principio físico que conduce este proceso está basado en el desplazamiento de una partícula en el seno de un fluido en función de la fuerza gravitacional. La velocidad de sedimentación o velocidad de desplazamiento de la partícula en el seno del gradiente es proporcional a la fuerza de centrifugación aplicada, según la siguiente relación:

## ES 2 170 637 B1

$$V = \frac{d^2 (\rho_p - \rho_1)}{18\eta}$$

donde,

10 V = velocidad de sedimentación

d = diámetro de la partícula

$\rho_p$  = densidad de la partícula

15  $\rho_1$  = densidad del fluido

$\eta$  = viscosidad del medio

g = fuerza gravitacional (fuerza de centrifugación)

20 Según éste principio, los quistes del organismo a concentrar migrarán en el seno del gradiente hasta que la densidad del quiste se iguale con la del fluido, en el caso de gradientes continuos, o hasta que alcance en su migración una solución de densidad superior a la de la partícula, en el caso de gradientes discontinuos.

25 La capacidad de separar ooquistes de *Cryptosporidium* en base a su viabilidad se basa en que el gradiente es hipertónico o hiperosmótico. Sólo las partículas capaces de mantener una densidad constante en un medio hiperosmótico podrán flotar homogéneamente a una determinada densidad. Los quistes viables de *Cryptosporidium* presentan esta capacidad, dada la extrema impermeabilidad de la pared del ooquiste. Los ooquistes separados según esta técnica son aquellos cuya extrema impermeabilidad de la  
30 pared impide el intercambio de agua a través de ella, por lo que mantienen una densidad homogénea en un medio hiperosmótico. Otros elementos particulados presentes en muestras biológicas complejas (como ooquistes inviables de *Cryptosporidium*, otros quistes de protozoos, levaduras o bacterias) no poseen salvo excepciones esta cualidad, dado que sus paredes son semipermeables y en un medio hipertónico tienden  
35 a perder agua del contenido plasmático. De esta manera, se modifica progresivamente su densidad al empobrecerse su contenido en agua, separándose en el gradiente hacia zonas de densidad superiores o inferiores. En otras palabras, el gradiente separa partículas en función de su densidad, acrecentando las diferencias en densidad de las partículas biológicas presentes en la muestra, siendo por extensión el método igualmente aplicable a cualquier partícula capaz de mantener su densidad en un medio hipertónico.

40 Tras la obtención de la banda donde se concentran los ooquistes viables de *Cryptosporidium*, para lo cual se utiliza una pipeta o una jeringa, la suspensión obtenida ha de ser diluida con 3 volúmenes de agua destilada, y lavada dos veces mediante centrifugación. Los quistes presentes en la suspensión pueden ahora ser fácilmente caracterizados utilizando técnicas de tinción, inmunomarcaje e inmunofluorescencia  
45 a microscopía óptica, mediante ELISA o PCR.

Utilizando esta técnica, aplicando el sedimento obtenido de heces de terneros previamente filtradas, obtenemos resultados comprendidos entre el 60 y el 95 % de recuperación de ooquistes. La variabilidad está determinada por la viabilidad de los ooquistes presentes en la muestra, determinada mediante la  
50 inclusión/exclusión de colorantes vitales (yoduro de propidio y DAPI según Campbell AT, Robertson LJ and Smith HV. 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3488-3493). Cuando se emplearon soluciones acuosas donde añadimos una cantidad conocida de ooquistes de *C. parvum*, previamente purificados utilizando este gradiente, se obtienen porcentajes de recuperación cercanos al 100 %. Los ooquistes recuperados utilizando esta técnica son viables en un 100 %  $\pm$  0.0, utilizando como criterio  
55 la inclusión/exclusión de colorantes vitales, el desenquistamiento *in vitro*, y la infectividad en cultivo *in vitro* sobre células MDCK.

Este proceso presenta ventajas significativas frente a los actualmente utilizados para la determinación  
60 de viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., entre las que destacamos:

- a.- Permite la concentración y purificación de ooquistes de *Cryptosporidium* simultáneamente a la selección de los ooquistes viables, a partir de suspensiones complejas de cualquier grado de turbidez

## ES 2 170 637 B1

o viscosidad, sin necesidad de concentraciones, purificaciones, tinción o análisis microscópico para determinar su viabilidad.

5 b.- Permite evitar el tratamiento con reactivos que pueden alterar las propiedades biológicas del material a purificar, como el desengrasamiento mediante extracción con éter o acetato de etilo, o la axenización mediante lavado con soluciones de hipoclorito sódico. Dichos tratamientos interfieren con la correcta identificación del enteropatógeno mediante técnicas inmunológicas o de biología molecular, por lo que el procedimiento proporciona oquistes en condiciones óptimas para su identificación.

10 c.- Reduce enormemente el coste de la concentración/purificación mediante el uso de filtros y la purificación de los oquistes utilizando la separación con partículas magnéticas u otros gradientes

15 d.- Facilita la valoración del riesgo asociado a la utilización del posible material contaminado, ya que determina la viabilidad de los oquistes de *Cryptosporidium*. Este proceso no requiere de la correcta aplicación e interpretación de complejas técnicas de inclusión/exclusión de colorantes vitales, desenquistamiento o infectividad *in vitro* o *in vivo*. Los oquistes de *Cryptosporidium* concentrados con este procedimiento son viables, y en consecuencia potencialmente dañinos para la salud. El procedimiento es más barato y en consecuencia aplicable como técnica de rutina, y puede ser llevado a cabo por laboratorios sin un elevado grado de especialización y entrenamiento.

### Manera de realizar la invención

25 La muestra a analizar ha de encontrarse en suspensión. Si se trata de alimentos, animales o partes de ellos, los quistes del enteropatógeno han de ser llevados a suspensión acuosa mediante desintegración o lavado. En el caso de sedimentos obtenidos de cualquier tipo de agua o líquido mediante cualquier proceso, se continua el protocolo a partir de este punto, dado que los quistes ya se encuentran en suspensión.

30 La suspensión problema ha de ser filtrada a través de un filtro de 0.5-1 mm de luz de malla. A continuación se sedimenta mediante centrifugación y se lava con solución A (previamente reconstituida mediante la adición en un matraz del contenido del sobre A y agua destilada c.s.p. 500 ml) a 4°C. Las soluciones B y C son reconstituidas (añadir 50 ml de solución A al contenido de los sobres B y C) y enfriadas a la misma temperatura antes de construir el gradiente en tubos de centrifuga de plástico transparente (preferiblemente tipo Sterilin<sup>®</sup>, preferiblemente de 25 ml de capacidad). Utilizando una pipeta de 10 ml suministrada como parte del kit, añadir 10 ml de solución C al tubo de centrifuga, y sobre esta, colocar 10 ml de solución B lentamente, sin agitar la interfase formada. A continuación, aplicar la muestra (unos 5 ml de suspensión) sin agitar el gradiente y someter a centrifugación según las instrucciones. A modo de ejemplo, puede utilizarse una centrifuga de sobremesa, adaptada con rotores basculantes, capaz de alcanzar 4,000 r.p.m. Los tubos se centrifugan a esta velocidad durante una hora, teniendo la precaución de seleccionar la velocidad de frenado menor posible.

40 Se retiran a continuación 3 ml de la interfase formada entre las soluciones B y C, diluyéndose hasta 10 ml con agua destilada. La suspensión es lavada 2 veces mediante centrifugación (4,000 r.p.m., 15 min), y resuspendida en 100 µl de agua destilada. En este punto, la muestra ha de ser analizada para la detección de los oquistes, pudiéndose utilizar microscopía óptica (siguiendo técnicas de observación directa, tinciones, microscopía de inmunofluorescencia u otras), técnicas inmunológicas (ELISA u otras) o técnicas de biología molecular (PCR u otras).

### Explicación de las figuras

50 Figura 1: Gradiente continuo.

Figura 2: Gradiente discontinuo de dos soluciones.

55 En cada figura, el diagrama de la izquierda representa el gradiente antes de ser centrifugado, y el de la derecha el gradiente tras el fraccionamiento.

M: Muestra aplicada.

I: Fracción de la muestra con densidad aparente superior al enteropatógeno viable.

60 II: Formas de resistencia del enteropatógeno viable purificado.

III: Sedimento formado por las partículas de densidad superior al enteropatógeno viable.

□ Solución B.

5 2 ■ Solución C.

Figura I

10

15

20

25

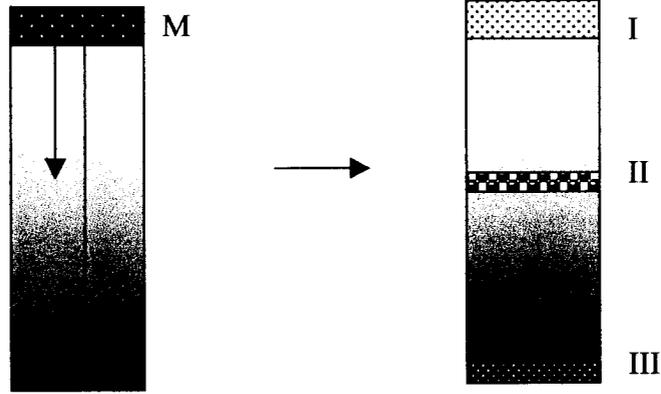


Figura II

30

35

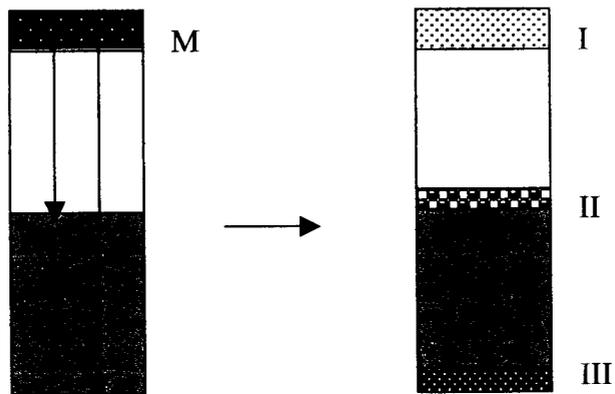
40

45

50

55

60



REIVINDICACIONES

1. Método para la selección de formas de resistencia viables de parásitos enteropatógenos **caracterizado** por:

5

a) llevar a suspensión acuosa los organismos a detectar potencialmente presentes en la muestra, mediante lavado o desfragmentación del material,

10

b) concentrar el volumen inicial de muestra en suspensión mediante filtrado o centrifugación para formar una suspensión concentrada;

15

c) separar selectivamente los organismos mediante la aplicación de la suspensión a un gradiente salino hiperosmótico formado por una sal disuelta en un tampón; gradiente salino de densidad comprendida entre 1.0 y 1.4 g/ml que permite la migración de los organismos para formar al menos una banda

20

d) aplicar una fuerza gravitacional suficiente para hacer migrar los componentes de la suspensión a través del gradiente de densidad, hasta equilibrar la densidad de la partícula en medio hipertónico con la del gradiente de densidad,

e) separar la banda de las que no contienen los organismos y determinar la presencia de estos mediante técnicas de diagnóstico.

2. Método para la selección de formas de resistencia viables de parásitos enteropatógenos según reivindicación primera **caracterizado** porque el gradiente salino se forma con cloruro de cesio.

25

3. Método para la selección de formas de resistencia viables de parásitos enteropatógenos según reivindicación primera **caracterizado** porque el gradiente salino se forma con bromuro potásico.

30

4. Método para la selección de formas de resistencia viables de parásitos enteropatógenos según reivindicación primera **caracterizado** porque los organismos a detectar pueden ser cualquier forma biológica microscópica osmóticamente inerte, capaz de mantener una densidad inferior a 1.4 g/ml en un medio hipertónico por un periodo superior a 10 minutos.

35

5. Kit para detección de formas de resistencia viables de parásitos enteropatógenos según el método descrito en las reivindicaciones anteriores y que está compuesto por tres sobres monodosis llamados A, B y C, tubos de centrifuga transparentes, pipetas e instrucciones para su uso. Los sobres monodosis contienen:

- Sobre A: Tampón Tris-EDTA en polvo

40

- Sobre B: Bromuro potásico en polvo

- Sobre C: Bromuro potásico en polvo

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C12Q 1/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
E	EMILIO ENTRALA et al. Cryptosporidium Parvum: Oocysts Purification Using Potassium Bromide Discontinuous Gradient. Veterinary Parasitology, 92 (200), 223-226.	1-5
A	US 5334509 A (NEIL H. RIORDAN) 02.08.1994	
A	US 5789190 A (JOSEPH H. CRABB et al.) 04.08.1998	

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**

17.06.2002

**Examinador**

M. Ybarra Fernández

**Página**

1/1