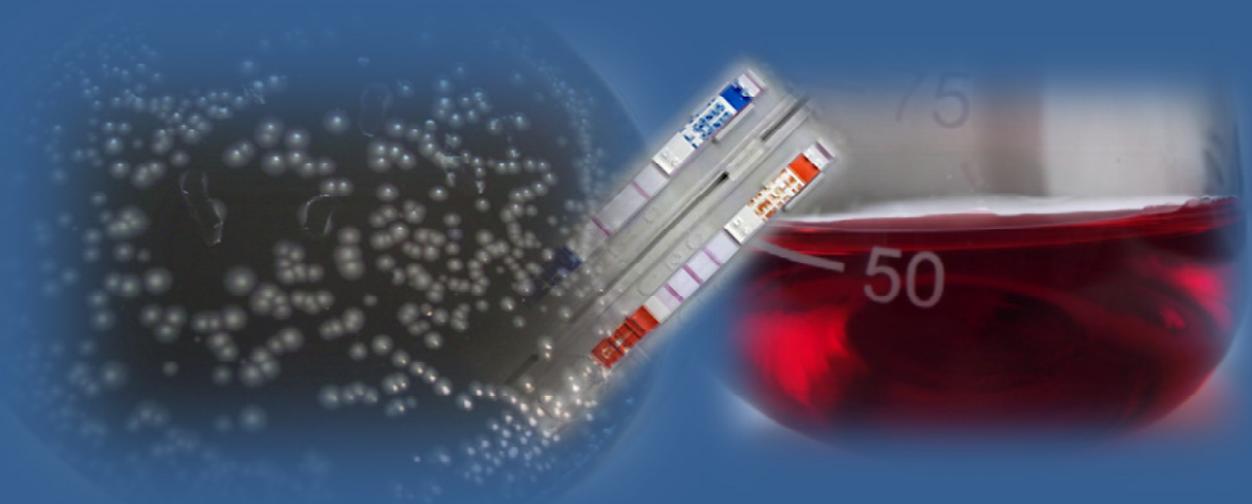




UNIVERSIDAD DE GRANADA - Instituto de Biotecnología
VIRCELL, S.L.

INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE UN
TEST INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA LA
DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE GÉNERO
Legionella, SEROGRUPO 1 Y ESPECIE DE
Legionella pneumophila EN MUESTRAS DE
CULTIVO



Memoria para la obtención del Grado de Doctor
Programa de Doctorado: Biotecnología (101.99.1.)

María Teresa Pardo García

Granada, 2013



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Instituto de Biotecnología

VIRCELL, S.L.

Departamento de Rapid Test

**INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE UN TEST
INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA LA DETECCIÓN
SIMULTÁNEA DE GÉNERO *Legionella*, SEROGRUPO 1 Y
ESPECIE DE *Legionella pneumophila* EN MUESTRAS DE
CULTIVO.**

María Teresa Pardo García

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Teresa Pardo García
D.L.: GR 615-2014
ISBN: 978-84-9028-841-2



**INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE UN TEST
INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA LA DETECCIÓN
SIMULTÁNEA DE GÉNERO *Legionella*, SEROGRUPO 1 Y
ESPECIE DE *Legionella pneumophila* EN MUESTRAS DE
CULTIVO.**

Memoria para la obtención del Grado de Doctor

(Programa de Doctorado: Biotecnología (101.99.1))

María Teresa Pardo García

Granada, 2013

Dirigida por el Doctor José Manuel Delgado Calvo-Flores (Vircell, S.L.),
y tutorizada por el Doctor Antonio Osuna Carrillo de Albornoz (Universidad de Granada)

El doctorando, María Teresa Pardo García, y el director de la tesis, José Manuel Delgado Calvo-Flores, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Julio de 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: José Manuel Delgado Calvo-Flores

Fdo.: María Teresa Pardo García



D. José Manuel Delgado Calvo-Flores, Dr. en Ciencias Físicas y Director del Departamento de Rapid Test de la empresa VIRCELL, S.L. (Granada):

CERTIFICA QUE:

El trabajo presentado por la Lda. María Teresa Pardo García, titulado “Investigación y Desarrollo de un Test Inmunocromatográfico para la Detección Simultánea de Género *Legionella*, Serogrupo 1 y Especie de *Legionella pneumophila* en Muestras de Cultivo”, ha sido realizado en el Departamento de Rapid Test de la empresa VIRCELL, S.L., bajo mi dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, considero que la doctorando reúne las condiciones necesarias para su lectura y autorizo la presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Granada, Julio de 2013

Fdo.: José Manuel Delgado Calvo-Flores

Parte de los contenidos de esta Tesis Doctoral han sido presentados en:

- The 7th International Conference on *Legionella*, Instituto Pasteur, Paris Francia, 2009. Presentación del poster científico titulado “Evaluation of a new immunochromatographic rapid test for the identification of *Legionella* from cultures”.

Así mismo, parte de los resultados han sido publicados como:

- Pardo-García, MT., Delgado-Calvo-Flores, J. M., Rojas-González, J., Fuertes-Ortiz, A. 2013. Evaluation of an immunochromatographic test for the identification of *Legionella* genus and *Legionella pneumophila* serogroups 1-15 from cultures. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013 Jun 21. pii: S0213-005X(13)00123-7. doi: 10.1016/j.eimc.2013.03.020. [Epub ahead of print]

AGRADECIMIENTOS:

Quisiera aprovechar estas páginas para agradecer sinceramente a todas aquellas personas que me han ayudado durante este tiempo y que han hecho posible este trabajo:

En primer lugar agradezco al Dr. Joaquín Mendoza Montero, Director General de la empresa Vircell, S.L., y al Dr. José Manuel Delgado Calvo-Flores, director del Departamento de Rapid Test de la empresa Vircell, S.L., por la confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto, por su dedicación, supervisión y apoyo. También a la Dra. Almudena Rojas y al Dr. José Rojas por su colaboración y aportaciones científicas en este trabajo.

A todos los departamentos de la empresa Vircell, S.L. y sus trabajadores, que me han ayudado con el material para esta tesis doctoral. En especial al Departamento de Seguridad Biológica, por su especial atención y ayuda en el cultivo de muestras, así como su colaboración y asesoramiento. A los Departamentos de Inmunología, Inmunofluorescencia, ELISA y Biología Molecular-I, y en especial a mis compañeros de departamento, por su ayuda y colaboración durante todos estos años.

También quisiera agradecer al Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, por su tutorización, ayuda y soporte en esta tesis doctoral. A toda la gente del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada por su colaboración.

A mis amigos. A todos aquellos que me han escuchado y animado cuando la cuesta se hacía muy pendiente. A mis compañeras de mesa.

Por último, a la gente más importante en mi vida, mi familia. Mis padres, mi hermana y mi marido. Sin ellos no estaría aquí.

ÍNDICE

Página

Resumen	1
1. Introducción	5
1.1. Características generales de <i>Legionella pneumophila</i>	6
1.1.1. Taxonomía y Descripción de <i>Legionella pneumophila</i>	6
1.1.2. Características biológicas de <i>Legionella pneumophila</i>	7
1.1.3. Morfología de la membrana de <i>Legionella pneumophila</i> . Antígenos	8
1.1.3.1. Lipoproteína asociada al peptidoglicano (PAL)	9
1.1.3.2. Lipopolisacárido (LPS)	10
1.1.3.3. Proteína Mayoritaria de la membrana Externa (MOMP)	12
1.2. Epidemiología y Patogénesis de la infección por <i>Legionella pneumophila</i>	13
1.3. Métodos de Detección de <i>Legionella</i>	15
1.3.1. Cultivo	16
1.3.2. Métodos Directos	19
1.3.3. Métodos Serológicos	20
1.3.4. Antigenuria	21
1.3.5. Análisis Bioquímicos	22
1.3.6. Técnicas Basadas en Ácidos Nucleicos	23
1.4. Legislación Sobre <i>Legionella</i>	24
2. Objetivos	29
3. Inmunocromatografía y Oro Coloidal	33
3.1. Inmunocromatografía	33
3.1.1. Componentes de la Inmunocromatografía	35
3.2. Oro Coloidal	39
3.2.1. Preparación, Tipos y Tamaños	40
3.2.2. Determinación de Parámetros de Validez	42
3.2.3. Conjugación con Proteínas	43
4. Materiales y Métodos	47
4.1. Materiales	47
4.1.1. Muestras Analizadas	47
4.1.2. Reactivos Usados	49
4.1.3. Inoculación de Placas	50

4.1.4. Materiales para Inmunocromatografía	51
4.1.5. Maquinaria e Instrumentación	51
4.1.6. Software	56
4.2. Métodos	57
4.2.1. Inoculación de Placas	57
4.2.2. Recogida de las Colonias de las Placas y Preparación a McFarland 1	57
4.2.3. Desarrollo del Test	58
4.2.3.1. Preparación de Anticuerpos Monoclonales y Línea Control	58
4.2.3.1.1. Preparación de Anticuerpos Monoclonales	58
4.2.3.1.1.1. Fusión	58
4.2.3.1.2. Purificación de Hibridomas de Anticuerpos Monoclonales	58
4.2.3.1.3. Procesado de las Fracciones de Purificación de Anticuerpos Monoclonales	59
4.2.3.1.4. Preparación de la Línea Control	60
4.2.3.2. ELISA	60
4.2.3.3. Western-Blot	61
4.2.3.4. Inmunofluorescencia	61
4.2.3.5. Preparación del Strip. Dosificación de Tarjetas	62
4.2.3.6. Preparación del Oro Coloidal	63
4.2.3.7. Determinación de la Mínima Concentración que Protege al Oro (MPC)	63
4.2.3.8. Conjugación de Anticuerpos Monoclonales al Oro Coloidal	63
4.2.3.9. Dosificación de Pads	64
4.2.3.10. Impresión de Covertape	64
4.2.3.11. Montaje de los Strips	64
4.2.3.12. Determinación del Sistema Óptimo. Procedimientos Generales	65
4.2.3.13. Preparación del Medio de Reacción	66
4.2.4. Evaluación del Test	66
4.2.4.1. Fundamento del Método y Protocolo de Desarrollo del Test	66
4.2.4.2. Lectura Visual	67
4.2.4.3. Determinación del Límite de Detección de la Técnica	68
4.2.4.4. Tratamientos Estadístico de los Datos	68
4.2.4.5. Estudios de Estabilidad	71
4.2.4.5.1. Estabilidad de los Strips	71
4.2.4.5.2. Estabilidad del Medio	72

5. Resultados	75
5.1. Placas Inoculadas	75
5.2. Desarrollo del Test	75
5.2.1. Anticuerpos Monoclonales	75
5.2.2. Purificación de Anticuerpos Monoclonales	76
5.2.3. ELISA para la Comprobación de la Actividad de los Anticuerpos Monoclonales	80
5.2.4. Unión de Lotes de Anticuerpos Monoclonales	81
5.3. Oro Coloidal	82
5.4. Determinación de la Mínima Concentración de Proteína que Protege al Oro (MPC)	84
5.5. Conjugación de Anticuerpos Monoclonales al Oro Coloidal	86
5.6. Determinación del Sistema Óptimo	87
5.6.1. Línea Género	87
5.6.2. Línea de Serogrupo 1	92
5.6.3. Líneas Género y Serogrupo 1	95
5.6.4. Solución de Problemas de la Línea Género	105
5.6.5. Solución de Problemas de la Línea Serogrupo 1	110
5.6.6. Línea de Especie	113
5.6.7. Líneas Género, Serogrupo 1 y Especie	118
5.7. Resultados Obtenidos por Inmunocromatografía	123
5.8. Resultados de la Valoración por ELISA e Inmunofluorescencia de Cepas del Grupo II Discrepantes	139
5.9. Tratamiento Estadístico de los Resultados del Análisis de Muestras con el Test Desarrollado	140
5.10. Resultados del Cálculo del Límite de Detección de la Técnica	143
5.11. Resultados de los Estudios de Estabilidad	144
5.11.1. Estabilidad de los Strips	144
5.11.2. Estabilidad del Medio	145
6. Discusión	149
6.1. De la Morfología de la Membrana de <i>Legionella</i> y la Epidemiología y Patogénesis de la Infección por <i>Legionella pneumophila</i>	149
6.2. De los Métodos de Detección de <i>Legionella</i>	153
6.3. De la Inmunocromatografía y el Oro Coloidal	155

6.4. De los Resultados	162
6.4.1. De las Placas Inoculadas	162
6.4.2. De los Anticuerpos Monoclonales	163
6.4.3. De la Preparación de Oro Coloidal y la Conjugación de Monoclonales	165
6.4.4. De la Determinación del Sistema Óptimo	166
6.4.4.1. De la Funcionalidad de los Monoclonales	166
6.4.4.2. De la Rotura de la Membrana	166
6.4.4.3. De las Condiciones de Reacción	170
6.4.4.4. De la Evaluación Inicial del Test	172
6.4.4.5. De la Solución de Problemas de la Línea Género y la Línea Serogrupo 1	172
6.4.4.6. De la Línea de Especie	175
6.4.4.7. De los Resultados con el Sistema Inmunocromatográfico Final	177
6.4.4.7.1. De la Unión de las Líneas	177
6.4.4.7.2. Del Sistema Final	178
6.4.4.7.3. Del Límite de Detección del Test	182
6.4.4.7.4. De las Estabilidades de los Strips y del Medio	182
7. Conclusiones	187
8. Bibliografía	191
9. Anexos	203
9.1. Anexo Materiales y Métodos	203
9.2. Anexo Resultados	210

ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS

A280: Absorbancia a 280 nanómetros

A320: Absorbancia a 320 nanómetros

A600: Absorbancia a 600 nanómetros

Ab: anticuerpo

AD: ácido deoxicolato

Ag: antígeno

ATCC: American Type Culture Collection/Colección Americana de Cultivos Tipo

BCD: acrónimo usado para designar la mezcla de conjugados de monoclonales de LPPA B, LPPA C y LPPA D

BCYE: extracto tamponado de levadura y carbón

BSA: albúmina sérica bovina

CAP: neumonía adquirida en comunidad

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propano

CHOOB: acrónimo usado para designar al grupo de legionellas: *L. pneumophila* serogrupo 1 Camperdown, *L. pneumophila* serogrupo 1 Heysham, *L. pneumophila* serogrupo 1 Oxford, *L. pneumophila* serogrupo 1 OLDA y *L. pneumophila* serogrupo 1 Bellingham

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DEV: Developer/solución desarrolladora

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen/Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ESP: especie, línea de detección de especie o *Legionella pneumophila* serogrupos 1 a 15

F1: Fracción 1

F2: Fracción 2

FNTP: medio compuesto de tampón fosfato, NaCl, Tween-20 y Polimixina-B

FNTPE: medio compuesto de tampón fosfato, NaCl, Tween-20, Polimixina-B y EDTA.

GÉN: género, línea de detección de género *Legionella*

HI: acrónimo usado para designar la mezcla de conjugados de monoclonales de LPS-1 H y LPS-1 I.

HI-LPN: acrónimo usado para designar la mezcla de conjugados de monoclonales de LPS-1 H y LPS-1 I y el monoclonal de especie LP3IIG2

HNTJ: Hospital Neurotraumatológico de Jaén

LD: Enfermedad del Legionario

LPPA (o PAL): lipoproteína asociada al peptidoglicano

Lpn(X): *Legionella pneumophila* serogrupo X, siendo X un número posible del 1 al 15

LPS: lipopolisacárido

LPS-1: lipopolisacárido del serogrupo 1 de *Legionella pneumophila*

LPS-1 AEF: línea de monoclonales de LPS-1 A, LPS-1 E y LPS-1 F dosificados conjuntamente

LPS-1 AEFI: línea de monoclonales de LPS-1 A, LPS-1 E, LPS-1 F y LPS-1 I dosificados conjuntamente

LPN: línea de detección de *Legionella pneumophila* serogrupos 1 a 15

Mab: anticuerpo monoclonal

McF: McFarland

MOMP: proteína mayoritaria de la membrana externa

MPC: mínima concentración de proteína que protege al oro

NL: N-Laurilsarcosina

NC: nitrocelulosa

NCTC: National Collection of Type Cultures/Colección Nacional de Cultivos Tipo

NP40: Nonidet P-40

NTP: medio compuesto por NaCl, Tween-20 y Polimixina-B

OD: densidad óptica

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMB: polimixina-B sulfato

POL: pad de poliéster

POLCAS: pad de poliéster bloqueado con caseína

POLCASENL: pad de poliéster bloqueado con caseína, EDTA y N-laurilsarcosina

ROC (curva ROC): característica operativa del receptor

SDS: dodecilsulfato sódico

Sg.: serogrupo

SR1: serogrupo 1, línea de detección de *Legionella pneumophila* serogrupo 1

T20: Tween-20

TA: temperatura ambiente

TrA: neumonía asociada al viajero

TS: tampón Tris salino

TX100: Tritón X-100

TX114: Tritón X-114

UFC: unidades formadoras de colonias

RESUMEN

RESUMEN

La bacteria *Legionella pneumophila* es la causante de la Enfermedad del Legionario (LD), la fiebre de Pontiac o el Síndrome Extrapulmonar. La LD puede causar una neumonía mortal. De todos los serogrupos de *L. pneumophila*, el 1 es el causante más común de LD, aunque otras serogrupos de *L. pneumophila*, e incluso otras especies, pueden producir la misma enfermedad.

El control de *Legionella pneumophila* en las instalaciones, ecosistemas o sistemas acuáticos creados por el hombre, es obligatorio en gran número de países. De los diversos métodos de identificación o detección de *Legionella*, el cultivo sigue siendo la técnica de referencia, seguido de algún método de confirmación.

Para la identificación de *Legionella* en muestras de cultivo, se ha desarrollado un test inmunocromatográfico basado en anticuerpos monoclonales diseñados frente a constituyentes específicos de la membrana de la bacteria. Estos son la lipoproteína asociada al peptidoglicano (PAL), el lipopolisacárido (LPS) y la proteína mayoritaria de la membrana externa (MOMP). Estos monoclonales se han adsorbido tanto a oro coloidal como a membranas de nitrocelulosa y se ha estudiado su reactividad. Para ello se han desarrollado métodos de rotura química de la membrana de la bacteria, implicando factores como temperatura, pH, salinidad, detergentes o tiempo de reacción, consiguiendo un medio y un método eficaz para lograr la exposición de dichos antígenos de membrana.

Se han analizado diversos grupos de muestras de cultivo, incluyendo especímenes procedentes de fuentes ambientales y clínicas con gran éxito. Para los resultados obtenidos, se han calculado diversos parámetros estadísticos, produciendo una valoración satisfactoria y demostrando que la clasificación de las muestras no fue aleatoria.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Legionella pneumophila es una bacteria Gram-negativa aerobia que puede infectar al hombre por inhalación de aerosoles^{1,2}. Puede encontrarse en ambientes naturales como ríos, lagos o fuentes, y sistemas de agua como torres de refrigeración, spas, hoteles o circuitos de agua sanitaria entre otros^{3,4}.

Fue identificada por primera vez en 1977 tras un brote de neumonía aguda ocurrido en una convención de legionarios en Philadelphia⁵ y su género fue establecido en 1979². Fue Joseph McDade⁶ quién descubrió el agente etiológico de dicho brote cuando tras el mismo se llevó a cabo una extensa investigación para determinar si el causante era algún tipo de microorganismo conocido. Inoculó cobayas con suspensiones procedentes de tejidos de pacientes de dicho brote y obtuvo exudados contaminados (provenientes de hígado, bazo y pulmón) con los que preparó suspensiones e inoculó sacos vitelinos de embriones de huevos de gallina, que murieron a los siete días siguientes. Con los frotis de los mismos realizó una tinción según el método de Giménez⁷ que le permitió observar numerosos bacilos. Esta bacteria aislada resultó ser reactiva con sueros procedentes de pacientes del brote de Philadelphia así como de otros brotes de enfermedades respiratorias anteriores de las que no se conocía la causa, como la ocurrida en Washington en 1965 o en Pontiac (Michigan) en 1968⁸.

Desde entonces se han encontrado más de 50 especies diferentes (J.P. Euzéby: www.bacterio.cict.fr) con numerosos serogrupos. De ellos *L. pneumophila* serogrupo (sg.) 1 es la causa más frecuente de la infección por *Legionella* en el ser humano⁹, aunque otros serogrupos como el 3, el 4, el 5 ó el 6 pueden causar con frecuencia legionelosis^{10, 11}.

Desde su descubrimiento han habido diferentes brotes a nivel mundial¹², y en España cabe destacar el mayor de todos ocurrido en Murcia en 2001^{13, 14}, el acaecido en Mataró en 2002¹⁵, los de la Comunidad de Aragón en 2004 y 2005¹⁶, en Pamplona en 2006¹⁷ o en Benalmádena (Málaga) en 2007, entre otros.

1.1. Características Generales de *Legionella pneumophila*

1.1.1. Taxonomía y Descripción de *Legionella pneumophila*

Legionella es una bacteria clasificada como *Proteobacteria*, clase *Gamma-Proteobacteria*, orden *Legionellales*, familia *Legionellaceae* y género *Legionella*⁴. Crece óptimamente a 35 °C pero puede hacerlo entre un rango de 25 a 42 °C^{2, 4, 18}. Es capaz de replicarse intracelularmente en protozoos y amebas como *Vahlkamphia*, *Hartmanella*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Echinamoeba*, *Cyclidium* ó *Tetrahymena*, así como en cianobacterias^{4, 19} y en macrófagos alveolares humanos²⁰.

De las más de 50 especies de *Legionella* conocidas²¹, destaca *L. pneumophila* por ser la causante de al menos un 90% de las infecciones causadas por la bacteria^{10, 21}, y de este porcentaje *L. pneumophila* sg. 1 por causar el 70-80% de las neumonías severas². Otras especies de *Legionella* causantes de brotes son *L. micdadei*, *L. dumoffi*, *L. bozemanii*, *L. feeli* y *L. longbeachae*².

L. pneumophila sg. 1 es una bacteria Gram-negativa que se tiñe débilmente^{4, 5, 22}, de forma alargada y con un tamaño medio de entre 0,3 a 0,9 µm de ancho por 1,5 a 20 µm de largo^{1, 4, 22}. Aerobia estricta, no esporulada, capnófila y débilmente sacarolítica^{1, 4, 20}. Motil debido al flagelo que posee (puede tener dos o ninguno dependiendo de la temperatura), exceptuando a *L. oakridgensis*, *L. londinenses* y *L. nautarum*^{2, 4, 22}. Catalasa, oxidasa, dismutasa, gelatinasa y de reducción de hipurato positiva (excepto los serogrupos 4 y 15)^{1, 4, 5}, no reduce nitratos ni ureasas y las reacciones de carbohidratos para oxidación o fermentación, son negativas. La mayoría de las especies son β-lactamasas positivas^{2, 4}.

Algunas cepas requieren isoleucina, leucina, fenilalanina y tirosina para crecer, además de los habituales hierro y L-cisteína en medio de cultivo^{1, 4, 23}, siendo en ocasiones una excepción a esta regla *L. jordanis*, *L. oakridgensis* y *L. spiritensis* ya que pueden crecer en ausencia de L-cisteína. Las características bioquímicas de la bacteria unida a la composición de ácidos grasos y ubiquinonas de su pared celular delgada, y la necesidad de aminoácidos como la arginina, cisteína, metionina, serina, treonina y valina, como principal fuente de energía²², hacen que estas propiedades puedan ser usadas para el diagnóstico y aislamiento de especies de *Legionella*.

1.1.2. Características Biológicas de *Legionella pneumophila*

Legionella se encuentra frecuentemente en aguas e incluso en lodos como el caso de *L. pneumophila*, *L. micdadei* y principalmente *L. longbeachae*²³, donde se multiplica fácilmente mientras que no sobrevive en ambientes secos²². Los ambientes alterados por el ser humano pueden favorecer su crecimiento, pues necesita de un contenido de nutrientes en el mismo que no suele haber en aguas móviles. Parece evidente que *Legionella* está asociada al biofilm²⁴ y necesita de protozoos en el medio ambiente para su crecimiento²³, donde es capaz de sobrevivir como parásito intracelular, además de en células de mamíferos, pudiendo replicarse en diferentes especies de amebas, protozoos ciliados y mohos, así como de macrófagos. Los protozoos que usan legionellas para su crecimiento les proporcionan a éstas la resistencia a las condiciones medioambientales adversas. El número de legionellas encontradas en aguas subterráneas es menor que en colectores de agua medioambientales construidos por el hombre, pudiendo ser quizás por la escasez de biofilm en las subterráneas^{2, 25}.

Para sobrevivir en el medio ambiente, *L. pneumophila* entra en la célula hospedadora ocupando un único fagosoma. El mecanismo de fagocitosis de *Legionella* por parte de los macrófagos está controlado por un sistema de receptores complementarios (CR1 y CR3)^{2, 4, 26, 27} y consiste en la separación de la vacuola de la vía endosomal para continuar la replicación y el bloqueo de la fusión con el compartimiento lisosomal rico en nutrientes (12-15 horas tras la infección)^{2, 26}. Los genes involucrados en este mecanismo son los denominados colectivamente **dot** (defective in organelle trafficking o defecto en el tráfico de orgánulos) que están encargados de alterar la vía endocítica²⁷, e **icm** (intracelular multiplication o multiplicación intracelular)^{24, 27-29}, y pertenecen al sistema de secreción tipo IV, crítico para la virulencia de *Legionella*²⁵. Algunos genes **dot** son esenciales para que *L. pneumophila* crezca en agar BCYE (buffered charcoal yeast extract o extracto tamponado de levadura y carbón)²⁸. Defectos en los genes **icm** o **dot** resultan en una fusión lisosoma-fagosoma máxima^{29, 30}. *L. pneumophila* induce apoptosis en estados tempranos de la infección seguida de una fase de necrosis y la formación de un poro. La fase final del ciclo de la infección es la muerte del hospedador y la liberación de la bacteria (unas 20 horas tras la infección). Se han descrito diferentes fases del crecimiento; multiplicativa donde no hay motilidad ni β -hidroxibutirato y, la no multiplicativa, donde se dan formas más pequeñas, hay motilidad y numerosas inclusiones de β -hidroxibutirato². En el caso de los protozoos se introducen numerosas

1. INTRODUCCIÓN

bacterias por vesícula². En el ser humano, donde puede producir una neumonía mortal²⁶, el ataque se lleva a cabo sobre los macrófagos alveolares.

Se ha identificado la proteína Mip (macrophage infectivity potentiator o potenciador de la infectividad por macrófagos) (24kDa) en la membrana de *Legionella* como una proteína necesaria para la completa virulencia de *L. pneumophila*. Esta proteína exhibe actividad isomerasa peptidil-propil-cis/trans³¹, y es requerida para la infección eficiente en cobayas, células fagocíticas mamíferas y protozoos. El gen *mip* es el primero que mostró estar involucrado en la patogénesis de hospedadores mamíferos y protozoos². Otros factores de virulencia son: citoxinas, proteínas de choque térmico, fosfolipasas, lipopolisacáridos, compuestos asociados con la adquisición de hierro y metaloproteasas². También se ha visto que la actividad de la fusión puede verse alterada por el ión Ca^{2+} ²⁹.

1.1.3. Morfología de la Membrana de *Legionella pneumophila*. Antígenos

La envoltura celular de las bacterias Gram-negativas, y por tanto de *Legionella*, está compuesta de la membrana interna, la membrana externa y el peptidoglicano (ver figura 1.1.3.1.).

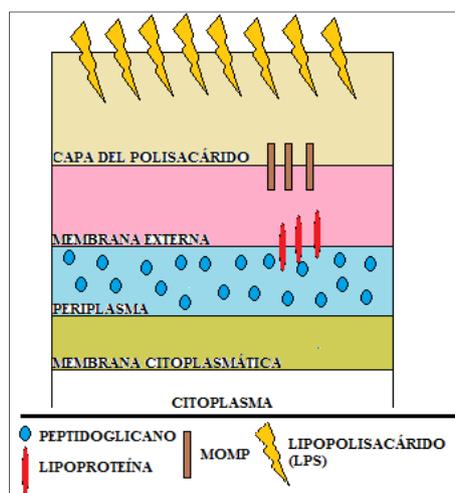


Figura 1.1.3.1. Estructura esquemática de la membrana de las bacterias Gram-negativas.

En estas membranas se encuentran componentes con actividad antigénica que son específicos para determinar el género *Legionella*, la especie o el serogrupo de *L. pneumophila*, lo que la hace interesante para su posible uso en sistemas de diagnóstico^{20, 32, 33}. Algunos de estos componentes útiles son: la lipoproteína asociada al peptidoglicano (PAL o LPPA,

peptidoglycan-associated lipoprotein), el lipopolisacárido (LPS, lipopolysaccharide) y la proteína mayoritaria de la membrana externa (MOMP, major outer membrane protein), que pueden servir para determinar el género, la especie y el serogrupo de *L. pneumophila*, respectivamente. Se trata de regiones de la membrana comunes a todas las legionellas como es el caso de PAL, sólo a *L. pneumophila* en el caso de MOMP y a *L. pneumophila* sg. 1 como sucede con el LPS-1 (LPS de legionellas del serogrupo 1). Otra posibilidad es el análisis de productos químicos, tales como ubiquinonas o ácidos grasos, aunque la determinación de *Legionella* no es completa, ya que por ejemplo a partir de los ácidos grasos sólo es posible identificar género (diferenciar *Legionella* de otra bacteria) y no la especie de *Legionella*³⁴. También se puede realizar un análisis por SDS-PAGE de su contenido en péptidos solubles y proteínas nativas^{2, 35}, o un análisis del ADN de *Legionella* teniendo en cuenta que entre diferentes especies la semejanza en su ADN es menor del 70%, mientras que en cepas de una misma especie puede llegar a ser mayor del 90%^{2, 22}.

Otro componente de la superficie de la membrana de *Legionella* y de gran interés diagnóstico es el anteriormente comentado gen *mip* (ver punto 1.1.2.) necesario para la virulencia de la bacteria. Su peso molecular está en torno a los 24 kDa para *L. pneumophila* y de 24 a 31 kDa para otras especies, lo que evidencia diferencias estructurales. Su uso permite la diferenciación de género y especie de *L. pneumophila*, pero no de serogrupos de la misma^{22, 31, 36}.

1.1.3.1. Lipoproteína Asociada al Peptidoglicano (PAL)

El PAL (o LPPA) es un antígeno soluble de superficie de 19 kDa, común y altamente conservado en el género *Legionella*^{37, 38}. Tiene gran homología con los genes que codifican el PAL de *Escherichia coli* y de *Haemophilus influenzae*^{20, 39, 40}, ya que hay múltiples epítomos y diferencias estructurales entre algunas especies al existir distintos patrones de reactividad³⁸. Se ha visto que está presente en todas las cepas de *Legionella*⁴¹, lo que puede permitir su uso en el diagnóstico del género.

El peptidoglicano interacciona con numerosas proteínas de la envoltura celular condicionando la estabilidad de las mismas, y una de ellas es PAL. Es similar al presente en *E. coli* donde el extremo N-terminal de la lipoproteína es hidrofóbico y es el responsable del anclaje de la proteína a la membrana. El extremo C-terminal interacciona con la pared celular del peptidoglicano³⁹. PAL se encuentra en la membrana externa de la bacteria unido por un

1. INTRODUCCIÓN

enlace N-diacilglicerol e interacciona fuertemente con la capa del peptidoglicano a través de su región carboxilo terminal, pero no está unido covalentemente^{20, 32}. Parece que PAL forma enlaces puente entre la membrana externa y el peptidoglicano³⁹ y que está implicado en un sistema involucrado en el mantenimiento de la integridad de la envoltura celular y el transporte de nuevos componentes sintetizados a través del periplasma (sistema Tol-Pal)^{32, 40} (ver figura 1.1.3.1.).

El gen ppLA (de PAL) codifica una proteína de 176 aminoácidos con un peso molecular calculado de 18.9 kDa. Se ha confirmado que esta proteína es la de 19 kDa que se encuentra presente en *L. pneumophila*, y aunque no es la mayoritaria de la superficie de la membrana, sí es una de las más inmunogénicas^{20, 38, 42}.

PAL puede estar involucrado en el sistema de receptores de inmunidad innata tipo Toll que están ligados al desarrollo de respuestas inmunes específicas. Estos receptores reconocen varios patrones moleculares asociados a patógenos y se ha demostrado que se activan por PAL⁴³.

1.1.3.2. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es un constituyente mayoritario de la pared celular de las bacterias Gram-negativas^{44, 45}. Se compone de tres regiones estructuralmente distintas: el lípido-A (lípido componente de las endotoxinas considerado responsable de la toxicidad en bacterias Gram-negativas), el núcleo de polisacárido y la cadena O-antigénica u O-polisacárido (porción de la molécula que determina la especificidad del serotipo y difiere entre las distintas cepas de la bacteria)⁴⁶. Ver figura 1.1.3.2.1.:

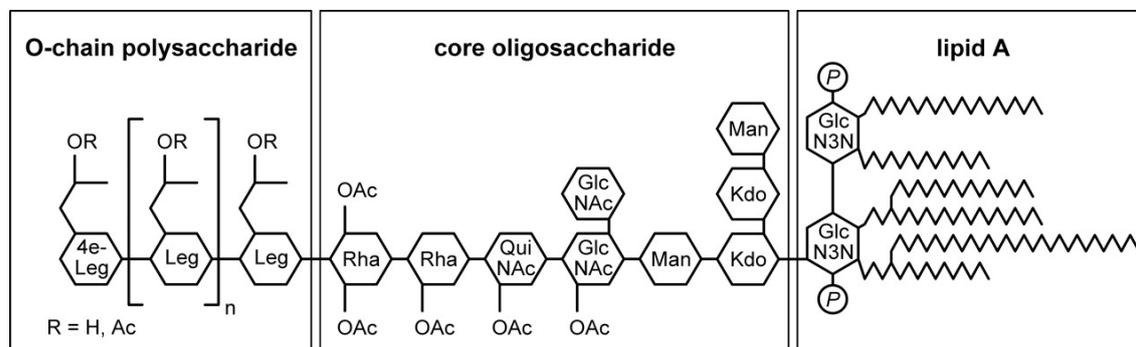


Figura 1.1.3.2.1. Estructura del LPS-1 de *Legionella pneumophila*. Adaptado de Journal of Bacteriology, July 1999, Vol.181, No. 13, p. 4138⁴⁷.

Abreviaturas: GlcN3N, 2,3-diamino-2,3-dideoxi-d-glucosa; Kdo, ácido 3-deoxi-d-*mano* -oct-2-ulosónico; Man, d-manosa; GlcNAc, 2-acetamido-2-deoxi-d-glucosa (*N*-acetil-d-glucosamina); QuiNAc, 2-acetamido-2,6-dideoxi-d-glucosa (*N*-acetil-d-quinovosamina); Rha, l-rhamnosa; Leg y 4e-Leg, derivan de legionaminico y ácido 4-epilegionaminico, respectivamente. OAc significa grupo O-acetilo.

En el caso de *L. pneumophila*, el LPS tiene una estructura inusual respecto a otras Gram-negativas⁴⁸, ya que predominan cadenas ramificadas de ácidos grasos y los ácidos grasos hidroxilados comunes en la región del lípido A están prácticamente ausentes^{42, 46, 49}. Esto, unido al elevado número de enlaces disulfuro, hace que sea muy poco soluble en agua^{44, 50}.

Es importante en la sepsis mediada por bacterias Gram-negativas, aunque el papel desempeñado por el LPS no se conoce exactamente. Sus propiedades se relacionan con la especificidad de serogrupo de *L. pneumophila*^{46, 51, 52}. El LPS producido por *L. pneumophila* es el determinante inmunogénico mayoritario de la superficie celular y confiere especificidad de serogrupo^{42, 53}. De hecho parece que la especificidad de serogrupo reside en la región O-antigénica del LPS⁵⁴.

El LPS de la mayoría de los serogrupos de *L. pneumophila* al ser analizado por SDS-PAGE se muestra con forma de bandas a semejanza de una escalera, lo que sugiere que es un lipopolisacárido por sus bandas regulares y repetitivas⁵⁵. Para serogrupos de *L. pneumophila* distintos el patrón es diferente en intensidad⁵⁶, y para especies diferentes a *L. pneumophila* no se ve este fenómeno tan acentuado, observándose un perfil distinto entre ellas que sin embargo posee un gran número de bandas, indicando la existencia de diferentes especies moleculares que pueden variar en intensidad y densidad³⁴.

El LPS de *L. pneumophila* tiene distintos epítomos de reactividad cruzada de serogrupo⁵¹, lo que se puede aplicar en el aislamiento de legionellas o mejorar la caracterización bioquímica de las mismas con la preparación de anticuerpos monoclonales (Mab) específicos a estos epítomos⁵⁷. Los cambios en la unión del LPS a los Mab se asocian a variaciones de las propiedades de virulencia de *L. pneumophila* durante el crecimiento intracelular^{44, 47}. La mayoría de los aislados clínicos (sobre todo de brotes epidemiológicos) portan un epítomo para LPS que reacciona con el Mab 2 del panel estándar internacional y el Mab 3/1^{51, 58}. Este Mab 3/1 reconoce al epítomo asociado a la virulencia del LPS⁴⁴. De hecho se ha determinado que el Mab 3/1 reconoce a un epítomo asociado con el grupo 8-O-acetil del ácido legionamínico que ha sido identificado como un componente básico del LPS de *L. pneumophila* sg. 1⁵³. Recientemente se ha identificado un gen denominado *lag-1* (gen asociado al lipopolisacárido-1) que codifica una O-acetiltransferasa que es responsable de la

O-acetilación del ácido legionamínico del O-antígeno de *L. pneumophila* y la unión del Mab 3/1 al LPS de *L. pneumophila* sg. 1⁵³ y no en otros serogrupos. Mutantes espontáneas con falta del gen *lag-1* pierden la reactividad con el Mab 3/1 y también la actividad acetiltransferasa ya que sin la presencia del gen *lag-1* no se acetila específicamente el LPS⁴⁴. Esto también da lugar a la pérdida de reactividad con el Mab 2, lo que permite la unión con otros Mab que no lo hacen con el LPS no modificado⁴⁷. La acetilación del LPS ocurre durante la etapa replicativa, ya que durante la primera fase, o fase exponencial, la bacteria reacciona fuertemente con el Mab 3/1, pero no lo hace en la segunda o post-exponencial⁴⁴.

El LPS es una molécula dinámica, lo que le permite modificar la superficie del patógeno de acuerdo a la fase de crecimiento y alternativamente contribuir a la transmisión o la replicación dentro de los macrófagos humanos⁴⁴. Además de permitirle construir estructuras lamelares y vesículas para liberar LPS soluble que puede modular la célula hospedadora, gracias a su dinamismo, puede incrementar la supervivencia en forma de aerosol o estabilizarse en biofilms⁵⁹.

1.1.3.3. Proteína Mayoritaria de la Membrana Externa (MOMP)

La membrana externa de todos los serogrupos de *L. pneumophila* contiene una proteína mayoritaria que existe como un agregado estable unido por enlaces disulfuro que se encuentra asociada al peptidoglicano^{60, 61}. A esta proteína de la membrana externa se le denomina MOMP^{20, 62, 63}.

MOMP tiene una masa molecular de entre 24 y 29 kDa y se ha determinado que puede funcionar como una porina, ya que forma canales en la membrana^{64, 65}. También se ha observado que tiene la capacidad de formar un complejo de alto peso molecular^{61, 64, 66} de unos 95 kDa, que en realidad está compuesto por cuatro unidades de entre 24 y 29 kDa. Este antígeno MOMP reacciona con un Mab tipo LP3IIG2 y requiere tratamiento con detergentes, lisozima y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), para su exposición y reacción, ya que se encuentra sólo parcialmente expuesto^{61, 64}. Se ha encontrado por análisis con el Mab LP3IIG2 en *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15 y no en legionellas no pneumophilas^{60, 64, 67}, por lo que podría ser un buen marcador para detección de especie *pneumophila*.

MOMP se une al complemento C3 y media en la unión de *L. pneumophila* por la vía de los ya mencionados receptores CR1 y CR3 del macrófago⁶². La proteína de 24 kDa parece

estar presente en cepas virulentas y avirulentas, por lo que su papel en la patogénesis se desconoce⁶⁶.

1.2. Epidemiología y Patogénesis de la Infección por *Legionella pneumophila*

L. pneumophila infecta al hombre por inhalación de aerosoles. Presenta dos formas clínico-epidemiológicas: la Enfermedad del Legionario (LD, Legionnaire's Disease) y la Fiebre de Pontiac. También provoca el Síndrome Extrapulmonar que ocurre cuando *L. pneumophila* se extiende desde el sistema respiratorio a otros órganos^{1, 22}. La LD es una enfermedad multisistémica que implica una neumonía indistinguible de otros tipos de neumonía^{2, 22}, con alto nivel de mortalidad⁴, mientras que la Fiebre de Pontiac es una enfermedad autolimitada con sintomatología similar a una gripe. Factores que influyen en la infección son entre otros el alcoholismo y el tabaquismo, la edad (ser mayor de 40 años), la ingestión de esteroides, enfermedades crónicas del pulmón y la diabetes, además del sexo, siendo más frecuente en hombres que en mujeres^{4, 19}.

Existen unos 15 serogrupos de *L. pneumophila*, pero el sg. 1 es el aislado más comúnmente (70-90%), seguido del sg. 6^{1, 4}. Otros serogrupos encontrados en Estados Unidos, Japón o Europa en muestras clínicas han sido el 3, 4 y 5, y en menor proporción el 2²¹. En los Estados Unidos, *L. micdadei* es la segunda causa de la LD mientras que en Australia está debida principalmente a *L. longbeachae*⁴.

La LD afecta a los sistemas nervioso, gastrointestinal y urinario⁴, siendo sus principales síntomas: fiebre, tos seca, dolor de cabeza, mialgia, rigor, disnea, diarrea y delirio. Los infiltrados alveolares son también más frecuentes que en otras neumonías^{2, 68}. El periodo de incubación es de 2-14 días y la enfermedad puede presentarse bastantes meses después y persistir durante semanas⁴. La neumonía provocada por *L. pneumophila* es indistinguible de otras neumonías por análisis de rayos-X pero a partir del tercer día del inicio de la infección pueden encontrarse diferencias, sobre todo en la acumulación de fluidos en el pulmón. El índice de infección de LD es de hasta un 5% en la población normal expuesta y de hasta un 14% en hospitales^{4, 22}.

La Enfermedad de Pontiac presenta los siguientes síntomas: escalofríos, fiebre, mialgia y dolor de cabeza⁴. El periodo de incubación es de 5 a 66 horas, aunque puede llegar a 7 días, y

1. INTRODUCCIÓN

la duración se encuentra entre 2 y 5 días^{4,22}. La enfermedad es más común que la LD, siendo el ratio de infección de un 95% en población expuesta²².

Por otra parte, el Síndrome Extrapulmonar se produce cuando *L. pneumophila* pasa del sistema respiratorio a otros órganos como son el bazo, hígado, riñón, miocardio, hueso y médula, articulaciones, nódulos linfáticos inguinales e intratorácicos, así como el tracto digestivo. El órgano más afectado suele ser el corazón y algunos de los síntomas más destacados son fiebre de baja intensidad, sudores nocturnos, pérdida de peso o malestar general. Cuando afecta al sistema nervioso puede provocar encefalomiелitis y neuropatías que involucren la envoltura del cerebelo. Este síndrome está provocado en la mayoría de los casos por *L. pneumophila*²².

Dependiendo del lugar donde se produce el contagio de LD, se distingue entre asociada al viajero (TrA: travel associated), nosocomial y adquirida en comunidad (CAP: community-acquired pneumonia).

La TrA se produce por inhalación de aerosoles y las principales fuentes de contagio son sistemas de agua fría o caliente como humidificadores, spas, piscinas y aguas termales⁴. Suele producirse por una inadecuada vigilancia de las instalaciones en hoteles, cruceros, centros comerciales, restaurantes o clubs. Es más común en el varón, siendo un factor de riesgo la edad, donde los hombres mayores de 40 años son los más afectados. Otros factores son la diabetes, el tabaquismo y alcoholismo, enfermedad crónica del corazón u otra inmunosupresión²². Se caracteriza por una baja tasa de infección, largos periodos de incubación, dispersión del foco de infección y dificultad de relacionar casos entre sí. El caso más representativo de este tipo de LD es el brote ocurrido en Philadelphia en 1976 en la convención de legionarios donde se descubrió *L. pneumophila* sg. 1².

La CAP se debe también a la inhalación de aerosoles contaminados. Las principales fuentes son las mismas que para TrA, añadiéndose las tuberías domésticas, los abonos y fertilizantes (en este caso *L. longbeachae* es la predominante)^{4, 22}. Se produce en centros comerciales, zonas industriales, residencias privadas o centros de ocio. Igualmente afecta más a hombres mayores de 40 años. Otros factores de riesgo son los del TrA, además de fallo renal crónico o exceso de hierro. En este caso, la neumonía severa tiene gran incidencia con un alto índice de mortalidad²², aunque ésta depende de la terapia antibiótica empleada².

La LD nosocomial se produce por la inhalación de aerosoles contaminados además de por aspiración e infección de heridas. Las principales fuentes son sistemas de agua caliente y fría sanitaria, piscinas naturales, sistemas de terapia respiratoria y tratamientos médicos^{4, 22}. Afecta a un rango de población mayor, ya que lo hace a mayores de 25 años y más a mujeres²². Factores de riesgo son los trasplantes, la cirugía, el cáncer, los linfomas, la diabetes, el tratamiento con máquinas respiratorias, la enfermedad crónica del pulmón o el corazón, así como el alcoholismo²². Para evitar estos casos, se recomienda el mantenimiento adecuado de los sistemas de agua y un buen control, así como revisiones periódicas de las instalaciones².

El rápido diagnóstico y el tratamiento con terapia antibiótica parece ser el más adecuado para combatir a *Legionella* en el organismo^{1, 37}. Se han realizado diferentes estudios con antibióticos⁶⁸ y parece que la eficacia de los tratamientos frente a *Legionella* podría mejorar si se combinasen entre sí^{68, 69}. Los β -lactámicos no son efectivos contra la LD²². Originalmente se administraba eritromicina², pero debido a los numerosos efectos secundarios que producía, se ensayaron otros como rifampicina, claritromicina, doxiciclina, co-trimoxazole, miembros de las 5-fluoroquinilonas, azitromicina, ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, gentamicina, tetraciclina, estreptomina, sulfadiazima, penicilina o cloranfenicol^{2, 4, 69, 70}. La FDA (Food and Drug Administration) aprueba la azitromicina y la levofloxacina para el tratamiento de la LD frente a la eritromicina⁷⁰, pero no lo hace con la rifampicina, ya que su uso no está avalado por resultados *in vitro*². Otros estudios han indicado que los mejores resultados se obtienen con tetraciclina y eritromicina⁶⁸.

1.3. Métodos de Detección de *Legionella*

El aislamiento de *Legionella* se realiza principalmente por medio del cultivo y el diagnóstico (anticuerpo (Ab) o antígeno (Ag)) puede realizarse por muy diversas técnicas que incluyen *métodos directos* (Inmunofluorescencia Directa (DFA)); *serológicos* (ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay o Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI o IFA en inglés), microaglutinación, hemaglutinación indirecta, contraelectroforesis); *detección de antígenos en orina* (antigenuria); *aglutinación con partículas de látex*, radioinmunoensayo (RIA), *hemaglutinación pasiva*, *inmuncromatografía*¹⁹; *análisis bioquímicos* (ácidos grasos, ubiquinonas, etc.) o detección de antígenos por *técnicas basadas en ácidos nucleicos* (técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)), entre otros^{8, 19, 23, 71}. También es posible la identificación de *Legionella* en

1. INTRODUCCIÓN

muestras ambientales por técnicas enzimáticas, aglutinación con partículas de látex, tipado con Mab o inmunocromatografía^{37, 72-74}. De todos ellos los más habituales son el cultivo, la serología y la antigenuria^{1, 2, 22, 75}. De hecho, el cultivo se considera la técnica estándar para la identificación de *Legionella*, seguido de otras técnicas de las anteriormente comentadas como métodos de confirmación^{2, 19}.

El diagnóstico de la LD debe de llevarse a cabo sobre todo en personas mayores de cuarenta años, pacientes inmunodeprimidos que no responden a los antibióticos β -lactámicos, o en aquellos individuos que hayan estado expuestos a un brote de *Legionella*²².

Usualmente el diagnóstico está más orientado a la detección de *L. pneumophila* sg. 1, ya que es la que causa mayor infección en el ser humano²², por lo que son de gran interés los métodos que la detectan.

1.3.1. Cultivo

El aislamiento de *Legionella* spp. se realiza principalmente en un medio de cultivo determinado que contiene L-cisteína, aunque algunas legionellas como *L. oakridgensis* o *L. spiritensis* no la necesitan para su crecimiento², así como también agar BCYE con α -cetoglurato^{2, 22}. Este medio tiene un típico color negro debido al carbón activo. Por su parte la levadura es la fuente de aminoácidos². Suele llevar aditivos cuya misión es la de reducir el crecimiento de otras bacterias, como por ejemplo son anisomicina, polimixina-B o cefamandol tamponado (puede inhibir algunas especies de *Legionella*). Algunas legionellas necesitan otros suplementos como la glicina o antibióticos, como vancomicina, combinados con cicloheximida o natamicina (fungicida opcional a la cicloheximida menos tóxico para el ser humano) denominándose este medio BCYE suplementado con GVPC (glicina, vancomicina, polimixina, cicloheximida)^{19, 73, 76}. Otros medios alternativos incluyen colorantes como el bromotimol azul o bromocresol púrpura para aumentar la diferenciación de *Legionella* sobre otros microorganismos. Por su parte el uso adicional de albúmina estimula el crecimiento de especies como *L. micdadei* o *L. bozemanii*^{2, 22}.

El cultivo sirve tanto para muestras ambientales como clínicas y se considera la técnica Gold Standard o de referencia para la identificación de *Legionella*⁷³. Todas las muestras han de ser homogeneizadas previamente al sembrado y debe eliminarse otra flora con el primer

cultivo. Las muestras se concentran por centrifugación o filtración o ambas técnicas si es necesario^{4, 22}.

En el caso de especímenes humanos, pueden ser lavados y aspirados bronquioalveolares, esputos, biopsias del pulmón y sangre². De estos, los lavados necesitan ser concentrados antes de su siembra^{22, 77}, mientras que en el caso de esputos las muestras se deben sembrar antes del inicio de la ingesta de antibióticos²². En este último caso, la siembra ha de realizarse de forma inmediata ya que la bacteria sobrevive muy mal en las secreciones respiratorias². Se recomienda su uso en pacientes inmunocomprometidos con neumonía severa, en infecciones nosocomiales, o en casos en los que el agente infeccioso sea distinto a *L. pneumophila* sg. 1²².

Para especímenes medioambientales se debe de concentrar la muestra de agua, que normalmente suele ser de un litro. Para eliminar otra flora presente suele hacerse un tratamiento ácido a pH 2.2 o con calor, aunque esto puede inhibir el crecimiento de *Legionella*^{22, 77, 78}.

El cultivo de las muestras suele realizarse con 0'1 o 0'2 ml con la técnica de siembra en superficie o extensión. La incubación se lleva a cabo a unos 36 ± 2 °C, en un ambiente húmedo y con un 2.5% de CO₂ durante al menos cinco días. Se obtienen colonias gris-blancas, brillantes, convexas y con un diámetro medio de tres a cuatro milímetros^{4, 22}. Un ejemplo es la foto de la colonia 1920.2 B (ver ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS) que se muestra en la siguiente figura:



Figura 1.3.1.1. Colonia de *Legionella pneumophila* serogrupo 1

(placa 1920.2 colonia B).

Esta técnica tiene como mayores inconvenientes la necesidad de tratar la muestra con ácido o calor para eliminar otras bacterias que no sean *Legionella*, el uso de antibióticos en el medio para el crecimiento de *Legionella*, el propio rendimiento del crecimiento de *L.*

1. INTRODUCCIÓN

pneumophila así como de otras especies o que hay algunas, como las ya mencionadas *L. micdadei* y *L. bozemanii*, que necesitan de otros requerimientos adicionales²². Otros inconvenientes son la cantidad de días necesarios para el crecimiento y que es relativamente poco sensible en el aislamiento (sensibilidad en torno al 60%), por lo que se requiere de un personal experimentado para su ejecución^{2, 22}. A pesar de todo sigue siendo el método más conveniente para la correcta caracterización epidemiológica de brotes⁷⁹, ya que es la técnica más específica (100% de especificidad)⁷⁵.

Cómo **métodos de confirmación** del cultivo se pueden citar el tipado con anticuerpos monoclonales, la aglutinación con partículas de látex o la inmunocromatografía. Los anticuerpos policlonales pueden producir reacciones cruzadas de unas especies con otras, así como con otras bacterias, por lo que se ha desarrollado un panel completo de **anticuerpos monoclonales** para el diagnóstico de *Legionella* que evitan estas situaciones^{2, 31, 80}. Debido a la diversidad de serogrupos de *L. pneumophila*, en 1986 se desarrolló un panel con siete Mab propuestos para subtipar *L. pneumophila* sg. 1^{2, 9}. Estos Mab se seleccionaron en base a su reactividad, reproducibilidad y facilidad de interpretación con unas 83 cepas de *L. pneumophila* sg. 1. Con ellos se hallaron 10 subgrupos de *L. pneumophila* sg. 1⁹. Para este análisis se vio que no influía la edad del cultivo, la concentración del Mab, la temperatura de incubación con el Mab o el tiempo invertido en ello, aunque lo que sí tenía influencia era la concentración del cultivo. Estos Mab y los subgrupos pueden verse en la siguiente figura:

Representative strain	Indirect immunofluorescence assay staining intensity with: ^a						
	MAB1	MAB2	MAB3	W32	33G2	32A12	144C2
Philadelphia 1	3	3	0	0	3	3	0
Allentown 1	3	3	0	0	3	0	0
Benidorm 030E	3	3	0	0	3	0	3
Knoxville 1	3	3	3	0	0	V ^b	0
France 5811	3	3	0	0	0	0	0
OLDA	3	0	0	0	0	3	3
Oxford 4032E	3	0	0	0	0	3	0
Heysham 1	3	0	3	0	0	3	3
Camperdown 1	3	0	0	0	0	0	0
Bellingham 1	3	0	0	3	0	0	3

Figura 1.3.1.2. Subgrupos de *L. pneumophila* sg. 1 identificados con siete anticuerpos monoclonales desarrollados en 1986. Tomado de Journal Clinical of Microbiology, Apr. 1986, Vol. 23, No. 4, p. 770⁹.

(V: resultados variables. 3: fluorescencia brillante, 0: no fluorescencia).

Tras este panel, en 1997 se desarrolló el denominado Panel de Dresden^{51, 58} donde se estudiaba, como en el caso anterior, el tipado de *Legionella* en serogrupos y especies, en función de los epítomos que reconocen dichos Mab. Éste contiene 98 Mab y de ellos unos 34 reconocen al menos dos o más serogrupos⁵¹. De este panel cabe destacar el anteriormente mencionado Mab 3/1 que reconoce el componente asociado a la virulencia⁵⁹. Dicho Mab puede ser un diferenciador de casos nosocomiales o TA y CAP, ya que en el primer caso son más frecuentes los resultados Mab 3/1 negativos y en los segundos Mab 3/1 positivos, asociándose así las cepas Mab 3/1 positivas a los brotes^{58, 62, 81, 82}. En el caso de muestras ambientales también es más frecuente el tipo Mab 3/1 negativo⁵⁸. El epítomo que reconoce dicho Mab no está presente en cepas pertenecientes a serogrupos distinto del 1 de *L. pneumophila*⁵⁸. En el caso de técnicas enzimáticas, la mayoría de los **ELISA** presentes en el mercado están diseñados para la detección de *L. pneumophila* sg. 1 y tienen alta sensibilidad y especificidad (70-100%), mientras que los existentes para *L. pneumophila* o el género *Legionella*, tienen una sensibilidad variable³⁷. Suelen tener un formato directo y usan anticuerpos policlonales específicos para *L. pneumophila* sg. 1 y/o anticuerpos de captura reactivos frente a extractos solubles de *L. pneumophila* y otras legionellas³⁷. Otro método de confirmación mencionado, son las **reacciones de aglutinación** que usan **látex** (partículas de poliestireno) sensibilizado con anticuerpos policlonales anti *L. pneumophila* sg. 1, anti *L. pneumophila* o anti *Legionella* spp., que están dirigidos a partes específicas de la pared celular (por ejemplo la gama *Legionella* Látex test de Oxoid, <http://www.oxid.com/uk/blue/index.asp>). Una limitación importante es que no detectan todas las especies de *Legionella*, ya que suele estar preparado sólo para una mezcla de legionellas frecuentes en el medio ambiente o que causan enfermedad. La sensibilidad y la especificidad suelen ser elevadas⁷⁴. En el caso de la **inmunocromatografía** para muestras ambientales procedentes de cultivos, estos detectan generalmente sólo *L. pneumophila* sg. 1 o éste y *Legionella* spp., por lo que su aplicación es limitada. Son sensibles y específicos con valores cercanos al 90-100%^{72, 73}.

1.3.2. Métodos Directos

La **Inmunofluorescencia Directa (DFA)** fue el primer método usado para detectar *Legionella* en tejido pulmonar y secreciones respiratorias, teniendo como mayor ventaja frente al cultivo que puede haberse iniciado la toma de antibióticos antes de la determinación². Se usan conjugados policlonales marcados con fluoresceína que reaccionan con las proteínas

1. INTRODUCCIÓN

externas de membrana de *L. pneumophila*, lo que está especialmente indicado en la detección de los diferentes serogrupos de *L. pneumophila*², aunque esta técnica no se recomienda para el diagnóstico de *Legionella* spp.²². La duración es de unas 2-3 horas o de días en el caso de muestras de esputo. Se usa con éxito en esputos expectorados, aspirados endotraqueales y biopsias pulmonares. Una de sus principales desventajas es que es difícil de leer²², ya que se realiza al microscopio y necesita de un personal entrenado y cualificado para su interpretación². La sensibilidad está entre el 25-75% y la especificidad es mayor del 99%^{2,81}, lo que no mejora al cultivo. A diferencia de la antigenuria, en la DFA no hay variación de sensibilidad entre casos asociados al viajero, adquiridos en comunidad o nosocomiales. Se han observado falsos positivos debido a *Staphylococcus aureus*⁸¹.

1.3.3. Métodos Serológicos

Los métodos serológicos para el diagnóstico de *Legionella* tienen la limitación de las posibles reacciones cruzadas con otros antígenos y que están restringidos a unas pocas especies frecuentemente aisladas³⁶. Incluyen los ya mencionados Inmunofluorescencia Indirecta (IFI o IFA en inglés) y ELISA, así como también las reacciones de aglutinación, entre otros^{2,37}.

En el caso de reacciones de **microaglutinación**, son fáciles de ejecutar y permiten el análisis de elevado número de muestras al mismo tiempo. La sensibilidad está en torno al 80% y la especificidad sobre el 95%¹⁹.

En el caso del **ELISA**, las placas suelen sensibilizarse con extractos de bacterias inactivados⁸³ o antígenos de LPS de los serogrupos más comunes⁷⁵ que detectan anticuerpos de *Legionella*. Puede utilizarse después de iniciar el tratamiento con antibióticos. La sensibilidad y la especificidad son aceptables aunque no demasiado elevadas. Permiten evaluar un gran número de muestras simultáneamente, pero podría mejorarse el diagnóstico si se empleasen los ya mencionados PAL o MOMP, ya que de esta forma aumentarían significativamente la sensibilidad y especificidad de los ELISA complementando los resultados obtenidos con LPS^{2,37}.

La **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI o IFA en inglés)** presenta buena sensibilidad pero depende de la seroconversión (15-20 días)⁷⁹. Debido a esto se recomienda el uso de una mezcla de anticuerpos anti inmunoglobulinas (Ig) G, IgM o IgA para la detección en todas las

fases. Es un método estudiado extensamente y disponible comercialmente. Frecuentemente se usa *L. pneumophila* sg. 1 Pontiac como antígeno, ya que la utilización de mezclas de antígenos de *Legionella* es complicado para la realización de un diagnóstico, y las reacciones cruzadas son más frecuentes con especies distintas a *L. pneumophila*². La sensibilidad para *L. pneumophila* sg. 1 está en torno al 70-80% y la especificidad sobre el 99%^{8, 19}. Para el género *Legionella* o la especie *pneumophila* no se dispone del dato exacto⁸¹.

Es importante que los test detecten el mayor número de inmunoglobulinas (G, M o A) posibles para aumentar la sensibilidad^{8, 23}. La IgM se produce al inicio de la enfermedad y es útil para el diagnóstico temprano, aunque algunos pacientes mantienen la IgM durante un largo tiempo, lo que limita su utilidad para detectar las fases tempranas. Así la serología, en ocasiones, necesita el análisis de muestras a tres y seis semanas, lo que alarga el diagnóstico comparado con otras técnicas como la antigenuria².

1.3.4. Antigenuria

En el caso de detección de *Legionella* en orina (antigenuria) los ensayos más utilizados son los enzimáticos y la inmunocromatografía, aunque también se puede emplear la aglutinación con partículas de látex^{84, 85}. En el caso de *L. pneumophila* sg. 1 lo que se detecta es el antígeno soluble de LPS para el sg. 1^{2, 72, 81}.

Los **métodos enzimáticos** permiten la detección temprana a los 1-3 días del inicio de la infección con alta sensibilidad (70-100%) y especificidad, aunque esta última es inferior al cultivo (80-85%)⁷⁹. Pueden utilizarse después de iniciar el tratamiento con antibióticos. La mayoría de los enzimo-inmunoensayos presentes en el mercado sólo detectan *L. pneumophila* sg. 1 con alta sensibilidad y especificidad, mientras que los existentes para *L. pneumophila* o el género *Legionella* tienen una sensibilidad variable³⁷. Suelen tener un formato de sándwich directo: usan anticuerpos policlonales específicos para *L. pneumophila* sg. 1 y/o anticuerpos de captura reactivos frente a extractos solubles de *L. pneumophila* y otras legionellas³⁷.

En el caso de la **inmunocromatografía con muestras de orina**, la sensibilidad está en torno al 80% y la especificidad es del 95%^{2, 10, 72}. La concentración de la muestra de orina puede aumentar la sensibilidad sin rebajar la especificidad²². La sensibilidad es mayor para casos de CAP o TA que para nosocomiales, es decir, para los casos en que el Mab 3/1 es positivo, ya que el test es más sensible para muestras tipo *L. pneumophila* sg. 1 Pontiac que

1. INTRODUCCIÓN

no-Pontiac^{22, 81, 86}. La rápida detección por medio de la inmunocromatografía en muestras de orina permite el inicio precoz de la terapia antibiótica². Normalmente los test inmunocromatográficos son específicos sólo para *L. pneumophila* sg. 1 y, aunque es el agente mayoritario causante de enfermedad en humanos, alrededor de un 40% de los casos no son diagnosticados correctamente². La inmunocromatografía está sustituyendo a los métodos enzimáticos por su rapidez, fiabilidad, fácil realización y comodidad, ya que no precisan de instrumentación como el caso del ELISA o la inmunofluorescencia, y su interpretación es visual².

Como mayores desventajas de la inmunocromatografía para muestras de orina se encuentra que no puede emplearse en pacientes con disfunción renal y con anuria (cese total de la secreción urinaria. Ausencia total de orina o en cuantía inferior a 50 ml en 24 horas), que pueden aparecer falsos positivos en un estado avanzado de la infección o que hay posibilidad de obtener resultados positivos después de la recuperación de la infección⁷², y como ya se ha comentado, la necesidad de concentrar las muestras para aumentar la sensibilidad^{2, 79, 87}. Finalmente, otra gran desventaja es el hecho de que detectan sólo sg. 1 quedando el resto sin diagnosticar².

En el caso de **reacciones de aglutinación** se suele usar **látex** (partículas de poliestireno) sensibilizado con anticuerpos poli o monoclonales dirigidos a partes específicas de la pared celular⁸⁴. Una limitación importante es que no detectan todas las especies de *Legionella* ya que suele estar preparado sólo para una mezcla de legionellas más frecuentes en el medio ambiente o que causan enfermedad. La sensibilidad y la especificidad no son elevadas.

1.3.5. Análisis Bioquímicos

Este tipo de análisis sirve en el caso de que se encuentre una nueva *Legionella* y se desee conocer a que especie o serogrupo de una misma especie puede pertenecer.

Se puede realizar un **análisis** para la caracterización de diferentes **grupos químicos** presentes en la membrana de la bacteria. Algunas reacciones químicas a realizar y que además deben ser negativas son: catalasa, oxidasa, reducción de nitratos, ureasa y carbohidratos. Otras reacciones son gelatinasas, actividad peroxidasa y β -lactamasa, hidrólisis del ácido hipúrico, autofluorescencia y oscurecimiento de agar-sangre suplementado con tirosina^{2, 5, 22}. Las más comunes son el análisis de ácidos grasos, carbohidratos y ubiquinonas²². El contenido en

ácidos grasos puede realizarse por cromatografía gas-líquido^{5, 35, 88}, lo que permite por ejemplo la clasificación de una bacteria dentro del género *Legionella*, al igual que el análisis de ubiquinonas que puede llevarse a cabo por cromatografía de capa fina en fase reversa, y que permite clasificar una *Legionella* dentro de una especie³⁵.

1.3.6. Técnicas Basadas en Ácidos Nucleicos

El análisis de **ácidos nucleicos** se usa normalmente para especímenes ambientales, aunque también se ha empezado a utilizar en muestras clínicas²². Con la PCR se puede detectar el género *Legionella* o la especie *L. pneumophila*, utilizando como diana el ARN ribosómico (16S ARNr) y ADNr (16S ADNr), genes que codifican la región heat-shock (dnaf), el gen de la ARNpolimerasa (*rpoB*) y el gen *mip*^{2, 22}. Tradicionalmente se ha usado ARNr para el género y el gen *mip* para ensayos específicos de *L. pneumophila*²². El gen *mip* parece ser genéticamente estable y no presentar recombinación homóloga³⁶.

La hibridación de ADN se ha considerado como un análisis definitivo para establecer la identidad de una cepa de *Legionella* o una nueva especie². El análisis de los genes 16S ARNr se ha usado para mostrar la relación filogenética de nuevas especies del género *Legionella*²². Se ha propuesto que miembros de un género que compartan menos del 97% del 16S ADNr se deben considerar de otra especie⁵. Por ejemplo, se ha realizado un esquema de clasificación de secuencias en base al gen *mip* y se ha podido distinguir inequívocamente la mayoría de las especies de *Legionella* analizadas^{2, 36, 73}.

La sensibilidad para muestras respiratorias está aproximadamente en un 85% y la especificidad es mayor del 99%^{22, 81, 89}. Se pueden detectar todos los serogrupos de *L. pneumophila* en infección temprana y en casos nosocomiales²². Puede usarse para muestras de lavados bronquioalveolares o recogidas de la zona de la faringe y nasofaringe, células mononucleares de sangre periférica, orina y suero².

Como mayores limitaciones presentan la necesidad del uso de controles, que no son análisis cómodos o fáciles de realizar, que existen pocos datos para su evaluación, los posibles inhibidores de la PCR que pueden dar falsos negativos, siendo dicha inhibición mayor en muestras de aspirados traqueales que en lavados bronquioalveolares^{22, 90}. Otros factores negativos son que sus reacciones no son específicas con otros microorganismos y que no distingue entre organismos viables y no viables^{22, 74}.

1.4. Legislación sobre *Legionella*

En muchos países existe una regulación para el control y la prevención de la legionelosis, existiendo para ello normativas o protocolos a seguir ante un posible brote de *Legionella*. España dispone de su propia normativa que regula las diferentes instalaciones, recintos, centros, lugares, etc., donde debe aplicarse. Existe una guía publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo: “Recomendaciones para la Prevención de la Legionelosis”, y un Real Decreto (RD): 865/2003, de 4 de Julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis^{91, 92}. También deberá tenerse en cuenta la Ley de Aguas 29/1985 del 2 de Agosto⁹³.

Las instalaciones se clasifican en función de la probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella*, pudiendo ser de: 1) alto riesgo: las torres de refrigeración, los condensadores evaporativos, humectadores, sistemas de agua caliente y fría sanitaria, instalaciones termales (spas, jacuzzis, piscinas terapéuticas, chorros a presión, etc.), equipos de terapia respiratoria o sistemas de agua contra incendios; 2) bajo riesgo: sistemas de interior de agua fría de consumo humano, sistemas de riego por aspersión, fuentes ornamentales, refrigeradores por aerosolización al aire libre, bañeras de hidromasaje o conductos de aire acondicionado^{91, 94-96}; 3) clasificación en función del riesgo en terapia respiratoria: equipos de terapia respiratoria, respiradores, nebulizadores y otros equipos médicos en contacto con las vías respiratorias⁹⁴.

Los propietarios de las instalaciones implicadas son los encargados del cuidado y mantenimiento de las mismas, así como del cumplimiento del RD 865/2003 y la notificación de los posibles brotes. Para ello deben llevar un registro de las operaciones de mantenimiento de las instalaciones y los encargados de su limpieza, los productos utilizados y el responsable técnico^{94, 95}.

Las medidas preventivas se basan en la aplicación de dos principios fundamentales, la eliminación o reducción de zonas sucias mediante un buen diseño de las instalaciones y el mantenimiento de las mismas, evitando aquellas condiciones que favorezcan la supervivencia y multiplicación de *Legionella*, con el control de la temperatura del agua y la desinfección continua de la misma. Para ello se deben aplicar diferentes RD o normas UNE que regulan las instalaciones frigoríficas, el reglamento de instalaciones térmicas de edificios (RITE), o los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (RD 3099/1977 8 Septiembre,

RD 1751/1998 31 Julio, RD 1218/2002 22 Noviembre, RD 140/2003 7 de Febrero, norma UNE 100030 IN)^{94, 96, 97}.

Ante un posible caso de legionelosis las autoridades sanitarias deben coordinar las acciones a realizar y realizar una investigación epidemiológica en función del RD 2210/1995 del 28 de Diciembre por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, que engloba los servicios básicos de vigilancia (notificación de enfermedades de declaración obligatoria (EDO), agrupaciones de casos, brotes e información microbiológica) y los sistemas especiales (registros de casos, muestras de seroprevalencia, SIDA y enfermedades inmuno-prevenibles)⁹⁴. Las actuaciones a realizar pueden ser de tres tipos: 1) limpieza y desinfección, 2) reformas estructurales, ó 3) paralización total o parcial de la instalación⁹⁴.

Para la prevención en el trabajo y los posibles riesgos laborales derivados de *Legionella*, se aplicará lo determinado por la Ley de Prevención de Riesgos Laborales 31/1995 del 8 de Noviembre, el RD 39/1997 del 17 de Enero por el que se establece el reglamento de los servicios de prevención, y los RD 664/1997 del 12 de Mayo y 374/2001 del 6 de Abril, para la protección de los trabajadores a agentes biológicos y químicos respectivamente^{94, 95, 98, 99}. Los diferentes biocidas que se pueden utilizar y su regulación están recogidos en el RD 1054/2002 del 11 de Octubre^{91, 100}.

Los parámetros límite de sustancias en agua vienen regulados por el RD 865/2003 del 4 de Julio, así como en la norma UNE 100030 IN^{94, 96}. En ellos se admite para *Legionella* un valor límite de 100 UFC/ml y que los análisis de aguas deben realizarse trimestralmente y quince días después de un posible tratamiento de choque, tanto en las torres de refrigeración como en los condensadores evaporativos^{91, 94, 96}.

Por todo lo anterior es muy importante la recogida de muestra para el análisis de *Legionella*, ya que un procedimiento incorrecto puede llevar a un resultado erróneo. La toma de muestra se realizará en función del elemento a analizar⁹⁴: para **depósitos de agua caliente y fría** se tomará un litro de agua preferiblemente de la parte baja del mismo, recogiendo, si existen, materiales sedimentados. Se debe medir la temperatura y la cantidad de cloro libre; para la **red de agua fría y caliente** se tomarán muestras en los puntos terminales de la red. En el caso del agua caliente el muestreo se realizará en la salida más cercana y en la más lejana del depósito, en la más próxima al lugar de retorno y otros puntos terminales de interés. Se tomará un litro de agua, aunque inicialmente se recogerán aproximadamente cien mililitros

1. INTRODUCCIÓN

rascando con un bastoncillo las paredes y arrastrando el posible depósito hasta completar el resto del volumen de agua. Se debe medir la temperatura y la cantidad de cloro libre; para torres **de refrigeración, condensadores evaporativos u otros aparatos de refrigeración** que utilicen agua en su funcionamiento y generen aerosoles, se tomará un litro de agua del depósito en el punto más alejado del aporte y en el retorno, y los posibles restos de incrustaciones. Se debe medir la temperatura y la cantidad de cloro libre; en otras instalaciones como **piscinas, pozos, fuentes, etc.**, la cantidad de muestra dependerá del tipo de instalación y su accesibilidad, debiéndose siempre de medir la temperatura y el cloro libre.

En general las muestras han de ser recogidas en envases estériles y se les debe añadir neutralizante. Es necesario que lleguen al laboratorio lo antes posible, manteniéndolas a temperatura ambiente en todo momento. Los recipientes deben de estar diseñados para evitar su fácil rotura y la deposición de sustancias en suspensión. Además han de transportarse protegidas de agresiones externas, según el Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera (ADR 2003) o el Reglamento sobre Mercancías Peligrosas de la Asociación de Transporte Aéreo Internacional IATA-DGR, 44 edición, de enero de 2003⁹⁴.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Desde la identificación de *L. pneumophila* como agente causante de neumonía, se han desarrollado test de diagnóstico en muy diversas áreas, que incluyen técnicas basadas en serología, métodos directos, detección en orina, análisis de PCR, cultivo, inmunocromatografía o aglutinación con partículas de poliestireno. Pero de todos ellos, el cultivo sigue siendo la técnica de referencia por su alta especificidad y su ambivalencia para muestras clínicas y ambientales, seguido de algún método de confirmación.

Por otro lado, la mayoría de los test de diagnóstico disponibles para la detección de *Legionella* están dirigidos al sg. 1 de *L. pneumophila*, mientras que otros serogrupos, como el 3, 4, 5 ó 6, u otras especies de *Legionella* como *L. micdadei* o *L. longbeachae*, pueden causar frecuentemente legionelosis.

Teniendo en cuenta la gravedad de la enfermedad causada por *Legionella* y la escasez de métodos de detección no orientados exclusivamente al sg. 1 de *L. pneumophila*, el objetivo principal de este trabajo es diseñar un método de diagnóstico que diferencie entre el sg. 1 y los serogrupos 2 a 15 de *L. pneumophila*, así como entre *L. pneumophila* y otra especie. Los objetivos específicos son los que se enumeran a continuación:

- Selección, estudio y valoración de anticuerpos monoclonales preparados contra antígenos específicos de la membrana de *L. pneumophila*.
- Diseño de métodos de rotura de la membrana de *Legionella* para la liberación de los antígenos específicos de la misma.
- Estudio de la conjugación de anticuerpos monoclonales a partículas de oro coloidal.
- Determinación de las condiciones de reacción en sistema inmunocromatográfico para la detección de antígeno.
- Evaluación de diferentes grupos de muestras de procedencia ambiental y clínica.
- Análisis de los resultados obtenidos para la evaluación del rendimiento del sistema de diagnóstico.

INMUNOCROMATOGRAFÍA Y ORO COLOIDAL

3. INMUNOCROMATOGRAFÍA Y ORO COLOIDAL

A continuación se expone a modo de introducción, y para poner en contacto al lector con la tecnología de cromatografía de flujo lateral o inmunocromatografía, una breve descripción de los principales factores y las características más importantes de la misma, así como de las propiedades y aplicaciones básicas del oro coloidal.

3.1. Inmunocromatografía

Desde la aparición de los primeros inmunoensayos, se ha buscado siempre, obtener un resultado rápido para intentar tratar al enfermo con eficacia y en la mayor brevedad posible, con el objetivo de proporcionarle una curación. En este tipo de diagnóstico es donde encaja la inmunocromatografía. Es un método rápido y sencillo de detectar anticuerpos (Ab), antígenos (Ag), hormonas, bacterias, etc., basándose en reacciones enzimáticas, inmunológicas, etc., que en muchos casos puede realizar cualquier persona. Un ejemplo claro de este tipo de test son las pruebas de embarazo que se venden en farmacias y que están al alcance de individuos de cualquier nivel socio-económico.

De forma esquemática, un test rápido funciona haciendo fluir una muestra por una membrana porosa, donde se encuentran inmovilizados los Ab o Ag que serán capaces de unirse al analito (Ag o Ab de la muestra) y retenerlo en la línea. Esta reacción de unión es visible por medio del color (rojo, azul, etc.), dependiendo éste también del tipo de partícula que se ha conjugado, como son el oro coloidal (rojo) o las partículas de látex (azules, rojas, verdes, etc.), por ejemplo. La interpretación es cualitativa, de forma que si hay color es positiva y si no es negativa (en otros sistemas puede ser al contrario). En otras ocasiones también puede cuantificarse dependiendo de la intensidad de la línea y conociendo los patrones de concentración.

Los componentes necesarios para un test inmunocromatográfico son¹⁰¹:

1) **backing o soporte**, que es la estructura “rígida” sobre la que va pegada la membrana. Puede ser de diferentes materiales y distintos grosores. El material depende de los fines y de la estructura del test. Sirve para dar consistencia a la membrana;

2) **membrana:** es el material poroso por donde fluye la reacción, normalmente de nitrocelulosa. Sobre ella se dosifican las líneas test y control;

3) **pad de conjugado:** de material inerte, en él se encuentra el Ab o Ag conjugado a látex o metal coloidal que se unirá al Ag o Ab que se pretende analizar;

4) **pad de muestra:** sobre él se añade la muestra de forma que se absorbe y se mezcla con el conjugado, fluyendo posteriormente todo por capilaridad por la membrana;

5) **pad de absorción:** es una almohadilla de papel del grosor adecuado para que por capilaridad arrastre a la muestra para que se complete el test facilitando así la ejecución del mismo;

6) **líneas test y control:** aparecen con el paso del flujo del conjugado unido al analito en el caso de la test (reacción positiva) y en el caso de la control con el paso del flujo del conjugado, e indica que la reacción ha ido bien. La línea control se elige en cada test en función de las necesidades que se planteen, como son el Ag o Ab a detectar, el Ag o Ab usado, etc. Por otro lado debe de no interferir con el resto de componentes que se estén usando; y

7) **casete:** es donde se sitúa el strip ya terminado para protegerlo y poder llevar a cabo la reacción. Proporciona los lugares de presión adecuados sobre el strip y hace que la reacción fluya adecuadamente.

El esquema básico del funcionamiento de una inmunocromatografía sería el que se muestra en la figura 3.1.1. Inicialmente la membrana (blanca en paso 1) está adherida al backing o soporte (gris) y sobre ella se encuentran inmovilizados los Mab o anticuerpos secundarios (negros) que conforman la línea test y la línea control respectivamente. Sobre la membrana se disponen los diferentes pads con el solapamiento correspondiente y de forma que el flujo sea posible. Para ello el pad de muestra (azul) solapa con el de conjugado (rojo en paso 1) y éste sobre la membrana. Al final del strip se encuentra el pad de absorción (marrón en paso 1) que recogerá todos los reactivos. En el paso 1, en el pad de conjugado se encuentran las partículas de oro coloidal conjugadas con los Mab y se añade la muestra, que en caso de ser positiva contendrá el antígeno correspondiente. En el paso 2, tras añadir la muestra, el oro coloidal conjugado se rehidratará y fluirá por la membrana (roja en paso 2) reaccionando con la línea test en caso de ser una muestra positiva. El flujo llegará a la línea

control y ésta retendrá partículas de oro conjugadas a Mab. En el paso 3, la reacción se ha completado y el exceso de reactivos, oro conjugado y antígeno no capturado, se recogerá en el pad de absorción (rojo en paso 3).

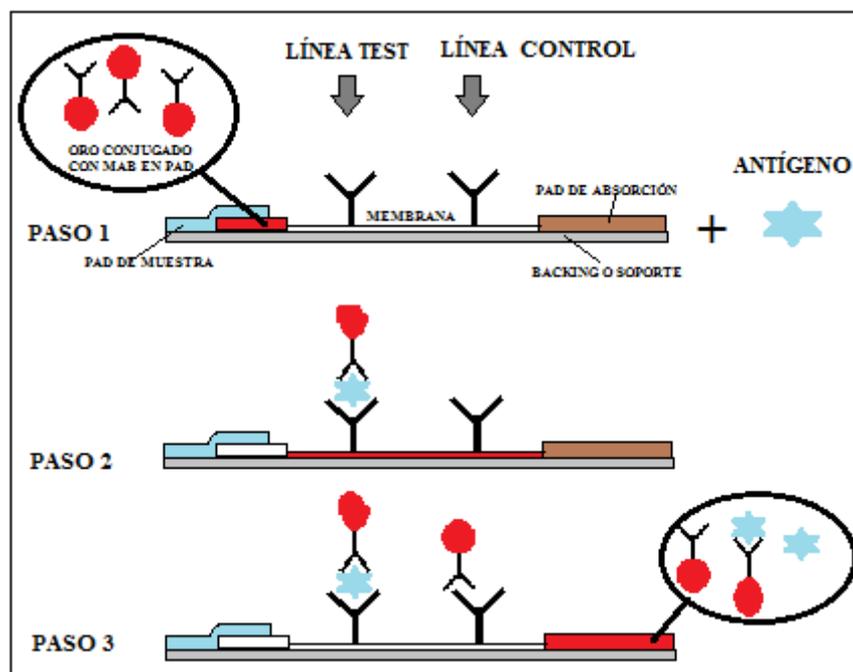


Figura 3.1.1. Esquema básico del funcionamiento de un sistema inmunocromatográfico (ver explicación en el texto).

En el transcurso del tiempo la reacción se completa, por lo que la intensidad de la línea irá aumentando hasta que ya no pasen más partículas de conjugado. El buen funcionamiento del test viene indicado por la aparición de la línea control. Esta clase de inmunocromatografía se llama Directa o Tipo Sandwich.

3.1.1. Componentes de la Inmunocromatografía

Se van a ver las características generales y más relevantes de cada uno de los componentes:

*Backing o soporte*¹⁰¹⁻¹⁰⁴: da rigidez a la membrana, ya que ésta por sí sola no posee consistencia y se rompe. Es un material duro pero flexible que debe soportar todos los componentes del strip y darle forma al mismo, ser consistente, permitir su posterior corte, unir fuertemente la membrana impidiendo que se despegue, así como facilitar que los diferentes reactivos que se añadan a la membrana fluyan sin problemas debido a un mal acoplamiento

con la misma o unas propiedades inadecuadas. Del mismo modo debe permitir que cuando se dosifiquen los Ag o Ab, éstos queden inmovilizados en las membranas, se puedan adherir a ésta y se fijen correctamente. Por lo general, están compuestos de poliestireno y puede tener diferentes grosores, dependiendo el elegido de los fines del test, el esquema final del strip y su configuración en el casete.

Membrana^{101, 105-107}: es la parte fundamental del test, ya que sobre ella se montan el resto de elementos y se inmovilizan los Ag o Ab que conformarán la línea test y la control. Puede ser de diferentes materiales, siendo muy importante elegir el adecuado dependiendo de los fines deseados^{101, 102, 105}. Puede estar fabricada de compuestos tales como nitrocelulosa (fuerzas de unión electrostáticas), PVDF (fluoruro de polivinilideno) (fuerzas de unión hidrofóbicas), Nylon (poliamidas) (fuerzas de unión electrostáticas) o acetato de celulosa, entre otras¹⁰¹. De ellos, la nitrocelulosa y el nylon son los más conocidos y comunes. La elección de un tipo de membrana u otra depende de: la capacidad de unir proteínas, la porosidad, tamaño medio de los poros y distribución de los mismos, y la fuerza de tensión^{101, 105}. El nylon cargado positivamente es el que más capacidad de unión de proteínas tiene¹⁰⁵, aunque otros materiales como nitrocelulosa, poseen la suficiente como para realizar ensayos inmunológicos donde se requiere inmovilizar Ab. Esta menor unión puede eliminar fondos no deseados en las reacciones que con el nylon por ejemplo, que posee mayor capacidad, pueden aparecer. A la hora de calcular la capacidad de unión de la membrana, hay que tener en cuenta el área superficial, factor que depende del tamaño de poro, siendo ésta mayor cuánto más grande sea el poro. Para calcular el volumen de muestra que puede pasar por la membrana por unidad de tiempo, se usa una ecuación que incluye la longitud (L), ancho (A), grosor (G) y porosidad de la membrana (P)¹⁰²:

$$L \cdot A \cdot G \cdot P = \text{capacidad de la membrana}$$

La **capacidad de unión de la membrana** se puede calcular determinando la cantidad de polímero por superficie disponible para la inmovilización de la proteína¹⁰¹. Estos parámetros pueden optimizarse para cada caso concreto en función de diversas pruebas de ensayo y error. La unión en la nitrocelulosa se produce por la interacción electrostática entre el fuerte dipolo del éster del nitrato con el fuerte dipolo del péptido de la proteína como puede verse en la siguiente figura:

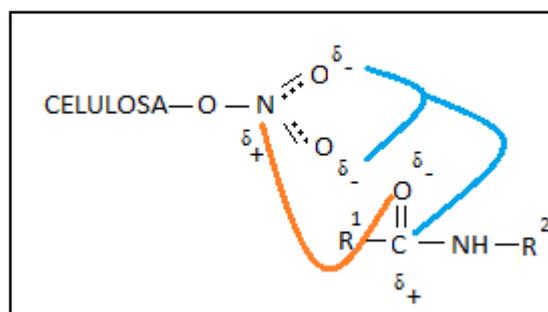


Figura 3.1.1.1. Interacción entre la membrana de nitrocelulosa y el péptido.

El **tamaño de poro de la membrana** es otro factor importante, ya que de él depende la cantidad de proteína que es posible unir a la membrana. Partículas con el mismo tamaño que el poro que la membrana, pueden no ser retenidas en ella, por lo que es recomendable que su tamaño sea unas dos veces aproximadamente el del poro. Por tanto, a mayor poro, menor será la capacidad de unión de la proteína a la membrana¹⁰⁵. Se pueden encontrar muy diferentes tamaños, existiendo poros por ejemplo de 0,1, 3, 5, 8 ó 10 μm entre otras medidas¹⁰⁷. Por otro lado, es importante que la **distribución de los poros** sea homogénea y regular, ya que ello permitirá que el flujo de la membrana sea más apropiado. Por último, la **porosidad** es otro factor importante a tener en cuenta en la elaboración del test¹⁰¹. La membrana está formada por poros que son el volumen de aire en las tres dimensiones que ésta posee y se expresa como porcentaje sobre el volumen total de la misma. De la porosidad depende el flujo de los reactivos por la membrana, ya que en función de la forma de los poros, el tamaño y la distribución de los mismos, el flujo será más o menos rápido¹⁰⁷. A mayor velocidad de flujo, menor tiempo de contacto hay entre el Ag y Ab o viceversa, por lo que la reacción puede ser menos sensible. El compromiso es, por tanto, encontrar un flujo adecuado con el objetivo del propio test. Otro factor es la **fuerza** de tensión de la membrana. Para que la membrana no se rompa es necesario proporcionarle un soporte como ya se ha comentado, ya que por ella misma no tiene suficiente resistencia para ser manejada¹⁰¹. Esto también depende del tipo de membrana. La más frágil es posiblemente la de nitrocelulosa, que se puede romper fácilmente, al contrario que el nylon, que puede manejarse sin problema, al igual que el PVDF. Otras opciones, además de ponerla sobre un soporte, pueden ser fabricarla con él incorporado de forma que se pueda manipular por el usuario sin gran dificultad. Normalmente en el diseño de una inmunocromatografía se eligen membranas de nitrocelulosa de 3 ó 5 μm por sus prestaciones, buen flujo de los reactivos y limpieza de la misma^{107, 108}.

3. INMUNOCROMATOGRAFÍA Y ORO COLOIDAL

Pads de absorción, muestra y conjugado^{101, 109}: normalmente estos componentes son de poliéster en el caso del conjugado y de poliéster, papel o fibra de vidrio para el de muestra. El de absorción suele ser de papel de varios milímetros de grosor. La función de cada uno de ellos es diferente. En el caso del **pad de muestra**, es sobre el que se añade la muestra a analizar. Su misión es distribuir adecuadamente en el pad de conjugado el volumen de muestra que se añade. Puede ser pretratado previamente con detergentes, proteínas, tampones, etc., para mejorar el desarrollo del test cuando sea necesario^{101, 108}. Otra de las ventajas del pretratamiento del pad es que puede evitar el bloqueo de la membrana, lo que es desaconsejable en la mayoría de los casos¹⁰⁷. El **pad de conjugado** es el componente sobre el que se seca el reactivo de oro con el Ag o Ab pegado a él. Cuando la muestra pasa, lo redissuelve y se une a él si el analito está presente. Un pad ideal debe tener baja capacidad de unión (para que permita liberar todo el reactivo y no se una nada de la muestra), buenas propiedades de mojado (para que la muestra entre fácilmente y redissuelva al conjugado), y constante capacidad de volumen de muestra (para que siempre sea reproducible y se pueda controlar como fluye el total de volumen añadido)^{101, 102}. Algunos materiales usados para tal fin y sus propiedades se muestran en la siguiente tabla¹⁰¹:

MATERIAL	GROSOR	VENTAJAS DE USO	PROPIEDADES
FIBRA DE VIDRIO	100 - 500 μm	alta capacidad de volumen baja unión inespecífica	difícil de manejar y cortar
CELULOSA	300 - 1000 μm	Alta capacidad de volumen muy baja unión inespecífica muy uniforme	frágil cuando se moja
POLIÉSTER	100 - 300 μm	baja unión inespecífica alta resistencia	baja capacidad de volumen

Tabla 3.1.1.1. Materiales más comunes usados como pads de muestra y conjugado en inmunocromatografía y sus propiedades.

El **pad de absorción** se sitúa al final del strip. Se usa para absorber el exceso de los reactivos que fluyen por la membrana. Normalmente son de papel de elevado grosor y se eligen en función de su compresibilidad, manejabilidad, etc.¹⁰¹.

Casetes: es el habitáculo plástico que contiene al strip y en el que se desarrolla la reacción. Puede llevar diferentes ventanas, como por ejemplo la zona donde se aplica la muestra o la de lectura de resultados. Es un elemento muy importante en el desarrollo del test y sobre todo en el resultado¹⁰⁷. Se compone de dos partes que encajan una en la otra. La parte superior lleva unas pestañas de presión que hacen que los reactivos fluyan por la membrana,

porque los obliga a salir de pad de muestra y llegar al de absorción. Una mala configuración en la presión puede hacer que la señal sea más baja de lo esperado produciendo resultados erróneos. Hay muchos tipos de modelos a elegir (redondos, cuadrados, múltiples, alargados, con bastoncillo, etc.), dependiendo de la idea del producto. Algunos diseños de casetes tienen en cuenta la estética exterior y otros son más sencillos, pero lo más importante a tener en cuenta es el interior, que es lo que hará que la reacción se desarrolle correctamente.

3.2. Oro Coloidal



Figura 3.2.1. Suspensión de oro coloidal. Vircell, S.L.

El oro coloidal es una suspensión de nanopartículas de oro, normalmente en agua, de intenso color rojo que alternativamente puede ser anaranjado o incluso púrpura. El color depende del tamaño de la partícula, que puede oscilar entre 2 ó 150 nm. Michael Faraday fue quién encontró la relación entre el color de la solución y el diámetro de las partículas^{110, 111}. La elección del tamaño del oro dependerá principalmente del límite de detección del test.

Este oro coloidal permite conjugar proteínas en su superficie, lo que posibilita su uso para la inmunocromatografía. Como ya se ha comentado, el funcionamiento es sencillo ya que, una vez se haya conjugado el Ag o Ab al oro, se puede secar en un pad que luego se rehidratará con el paso de la muestra. Si la reacción es positiva, en la línea se obtendrá un color rojo-rosa que será el que proporciona la partícula de oro (ver figura 3.1.1.).

El oro coloidal es un material versátil y de fácil preparación, que puede usarse porque es estable conjugado a proteínas y no se agrega fácilmente, como puede ser el caso del poliestireno. Si se prepara adecuadamente es muy estable en el tiempo¹¹⁰.

3.2.1. Preparación, Tipos y Tamaños

Para preparar una suspensión de oro coloidal hay que tener en cuenta primero el tamaño que se desea de partícula, ya que el método puede variar dependiendo del nucleante o los reactivos. El tamaño estándar de oro coloidal oscila entre 20 y 45 nm, variando también el color entre ellos¹¹². A un mayor tamaño, el color rojo se hace más intenso. Así el de 45 nm es más rojo que el de 30 nm, lo que puede aumentar la señal de la línea test¹¹³.

Es muy importante ser cuidadoso en la elaboración del oro coloidal ya que si no se hace correctamente, éste nuclearía inadecuadamente formando partículas de un tamaño inapropiado, pudiendo obtenerse agregados de color púrpura o marrón^{113, 114}. El tamaño también depende de la fuerza del reductor, de forma que a mayor capacidad, menor será el tamaño de la partícula.

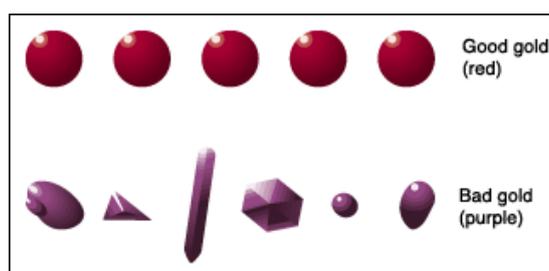


Figura 3.2.1.1. Diferencia de color y homogeneidad de oro bien y mal preparado. Tomado de Chandler, J. *et al.*, IVD Technology, March 1st 2000¹¹³

Por lo general, para la elaboración del oro coloidal se parte del ácido tetracloroaurico (HAuCl₄). La reacción consiste en que un reductor (citrato sódico, borohidruro sódico, fósforo amarillo, tiocianato sódico, etc.) dona los electrones a los átomos de oro cargados positivamente, y se produce oro atómico. La reacción de reducción que ocurre es la transformación de Au³⁺ en oro atómico, Au⁰, y se puede escribir como^{115, 116}:



Tras añadir el reductor, todos los iones de oro se van transformando en oro atómico hasta que se alcanza el estado de supersaturación. Es entonces cuando se produce la nucleación por agregación de las partículas presentes. Este es un proceso muy rápido y de él dependerá en gran parte la calidad del coloide. El crecimiento de la partícula seguirá dándose en función del

reductor usado y su fuerza, hasta que se forme completamente la partícula de oro coloidal. Se produce un cambio de color del amarillo inicial a un tono rojo intenso. En pasos intermedios, el color amarillo pasa a incoloro con tonos negros y a continuación cambia rápidamente a negro azulado, negro y finalmente rojo. Pueden verse estos cambios en la figura 2.2.1.2.



Figura 3.2.1.2. Cambios de color en la preparación de oro coloidal. Vircell. S.L.

Estas partículas están cargadas negativamente, lo que da lugar a la capa “Potencial ZETA”^{113, 117}. Esta carga negativa alrededor, permite a las partículas repelerse unas a otras y mantenerse estables en la suspensión.

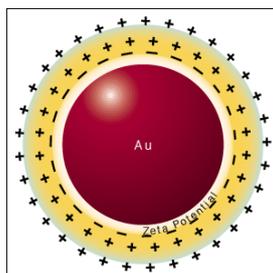


Figura 3.2.1.3. Partícula de oro rodeada de la doble capa iónica. Tomado de Chandler, J. *et al.*, IVD Technology, March 1st 2000¹¹³.

Existen diferentes protocolos para la preparación de oro coloidal. La técnica más usada sigue siendo el método desarrollado por Frens¹¹², que realizó un estudio de cómo controlar el tamaño de partícula en función de las cantidades de reductor añadido^{118, 119}, lo que ha permitido la elaboración de diferentes tamaños de oro coloidal estables en el tiempo. Hay otros métodos como el obtenido por reducción con hidroxialmina¹¹⁸, aunque la elaboración de éste último parte de las denominadas “semillas” (2-3 nm). El oro hidroxilamina tiene un tamaño final de entre 40-50 nm. Se trata de un método más lento y laborioso, pero el coloide tiene un color mucho más llamativo debido a su mayor tamaño. Hay diferentes procedimientos de preparar las semillas^{120, 121}, como por ejemplo por radiación ultravioleta. Otros métodos no necesitan radiación y son más sencillos de llevar a cabo, involucrando

únicamente procesos químicos^{118, 122}, y otros son mucho más sofisticados como la reducción fotoquímica o la electrodeposición por radiación¹²³, que necesitan una instrumentación mucho más sofisticada y compleja.

3.2.2. Determinación de Parámetros de Validez

Una vez obtenida la solución de oro coloidal hay que comprobar si efectivamente es de buena calidad, el tamaño de partícula es el deseado, el color es el esperado o si es monodisperso. Para ello existen diversas formas que incluyen desde la medida espectrofotométrica hasta la visualización al microscopio electrónico, como describen Chaudhuri y Raychaudhuri¹²⁴, Chun¹¹⁴, Bozlee y Exarhos¹²⁵, o Mallick *et al.*¹²⁰ entre otros autores.

Un buen oro será monodisperso cuando todas sus partículas sean más o menos de igual tamaño y estén poco agregadas¹²⁴. En el caso de la medida espectrofotométrica, los parámetros que indican la monodispersión son la absorbancia máxima y la relación de absorbancias a 575 y 500 nm. El oro coloidal de entre 20-40 nm, el más comúnmente usado en inmunocromatografía, suele producir un máximo a 520 nm¹²⁰, y a 575 nm se produce una absorbancia típica de los coloides¹²⁵. Otro parámetro es la medida a 540 nm, que es la longitud de onda a la que se produce una resonancia de los plasmones superficiales en el proceso de formación¹²⁶⁻¹²⁸. La concentración del oro se suele medir con la A540. Un ejemplo de medida es la curva de la figura 5.3.1. del capítulo resultados.

Es posible ver la calidad del oro por medio de microscopia electrónica de transmisión (TEM). La observación por TEM produce imágenes de las esferas del oro coloidal^{113, 121} que pueden informar de si las partículas son regulares, si forman agregados o no, si están solapadas unas con otras o de si el tamaño es el adecuado. Es por todo ello una herramienta útil en la determinación de la calidad del oro coloidal.

Por otro lado, la estabilidad del oro coloidal depende, entre otros factores, de la fuerza iónica del medio, del pH, de las proteínas que pueden añadirse para estabilizarlo, etc.¹¹⁵. Con una alta fuerza iónica, las partículas se agregan, coagulan y precipitan, ya que se rompe la estabilidad coloidal debido a las repulsiones electrostáticas. La adición de proteínas como la BSA (bovine serum albumin o albúmina de suero bovino) puede contribuir a la estabilización del medio al unirse a la superficie del oro, aún cuando haya una elevada concentración de

electrolito^{108, 122, 127, 129, 130}. Todos estos factores se deben de tener en cuenta en la preparación de un oro coloidal o un conjugado, para que se mantengan estables en el tiempo.

3.2.3. Conjugación con Proteínas

Como ya se ha comentado, el oro coloidal permite elaborar un test sencillo de realizar y fácil de interpretar por medio de la aparición o no de bandas de color. Se pueden conjugar diferentes proteínas, Ag, Ab, etc., que pueden estar incluso marcadas con yodo o peroxidasa^{130, 131} en función de lo que se quiera determinar.

Antes de pasar a la unión del Ab o Ag al oro coloidal, se deben conocer las condiciones necesarias para ello, lo que significa determinar la concentración de sal y pH del medio, y la concentración a la que debe unirse el Ag o Ab a la partícula de oro. Estos parámetros se determinan experimentalmente para cada proteína a conjugar, ya que dependerán también del punto isoeléctrico de las mismas. Se debe calcular la mínima concentración de proteína que protege al oro (MPC: minimum protective concentration)^{114, 129, 131} y lo estabiliza, por debajo de la cual el oro se agrega y por encima de la cuál es estable, pero sin ganancia en la respuesta. Para su determinación se realiza un barrido con oro a diferentes pH, generalmente 5, 7 y 9, fuerza iónica, dilución y tamaño de coloide^{129, 131}. A cada una de estas condiciones se le une una pequeña cantidad de proteína a distintas concentraciones (del orden de microgramos/mililitro) en el mismo tampón usado para diluir el oro, de forma que tengamos una serie de datos que se podrán representar gráficamente, como puede verse en la figura 3.2.3.1. La prueba acaba con la adición de NaCl, el cuál coagula el coloide si este no está estabilizado por la proteína¹¹⁴. Con este ensayo se conocerá el pH, dilución, fuerza iónica y cantidad de proteína a la que se puede realizar la conjugación. Por lo general, se obtiene una curva que en su parte final es una recta, de forma que la MPC corresponde a la primera concentración de proteína donde se observa una caída significativa en la absorbancia y ésta se hace relativamente constante¹³².

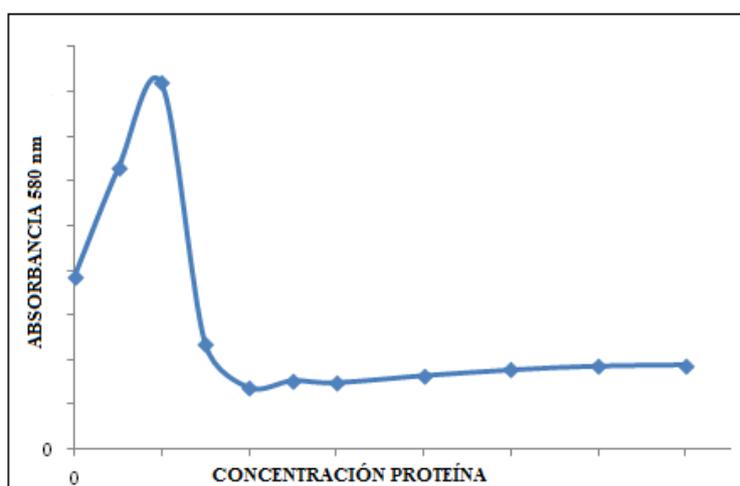


Figura 3.2.3.1. Representación esquemática de una curva obtenida para una MPC

(representación de la concentración de proteína añadida al oro frente a la absorbancia a 580 nm).

Tras conocer la MPC, se debe pasar a una escala mayor y es cuando se realiza la conjugación, adicionando la proteína a conjugar según las proporciones determinadas en el microensayo.

En la preparación de un conjugado, otro factor a tener en cuenta es el agente bloqueante, su concentración y compatibilidad con el test. Debe hacerse un estudio para determinar las condiciones más apropiadas. Uno de los principales bloqueantes es la albúmina sérica bovina (BSA), pero pueden añadirse otros como la caseína, copolímeros como el polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), polivinil alcohol (PVA), etc.^{108, 122, 127, 129, 130}.

Para unir el Ab o Ag al oro, una vez esté en las condiciones de pH y fuerza iónica adecuadas, éstos se adicionan en agitación, como recomiendan Geoghegan¹²⁹, y Geoghegan y Ackerman¹³¹. Posteriormente debe añadirse un agente bloqueante para estabilizar las partículas y parar el proceso de adsorción. Copolímeros como el PEG son de lo más utilizados. Como paso final, el conjugado debe lavarse varias veces para eliminar los Ag o Ab no unidos y bloquear todos los sitios libres del oro. Tras este proceso el conjugado debe ser estable y es cuando puede evaluarse, una vez conocidos los parámetros espectrofotométricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Muestras Analizadas

Se han analizado un total de 211 muestras procedentes de:

Grupo I) 42 legionellas de diferentes colecciones de referencia (de procedencia ambiental y clínica) (42 *Legionella* género, 27 *Legionella pneumophila* (17 *L. pneumophila* sg. 1 + 14 *L. pneumophila* serogrupos 2-15)): National Collection of Type Cultures (NCTC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (o Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ)) y American Type Culture Collection (ATCC) (ver Tabla 4.1.1.1.).

Tabla 4.1.1.1. Cepas bacterianas de *Legionella* de colecciones de referencia usadas.

CEPA BACTERIANA	DESIGNACIÓN DE LA CEPA	NCTC/DMSZ/ATCC No.
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Heysham	Heysham-1	NCTC ¹ 12029
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Benidorm	Benidorm 030E	NCTC 12006
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Camperdown	Camperdown-1	NCTC 12098
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Kingston	Kingston-1	NCTC 11378
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Bellingham	Bellingham-1	NCTC 11404
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Knoxville	Knoxville-1	NCTC 11286
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Allentown	Allentown-1	NCTC 12024
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 France	France 5811	NCTC 12007
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 OLDA	OLDA	NCTC 12008
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Pontiac	Pontiac	NCTC 11191
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Oxford	Oxford 4032E	NCTC 12009
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Cambridge	Cambridge-1	NCTC 11231
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Philadelphia	Philadelphia-1	ATCC ² 33152
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 2	Togus-1	ATCC 33154
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 3	Bloomington-2	ATCC 33155
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 4	Los Angeles-1	ATCC 33156
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 5	Dallas 1E	ATCC 33216
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 6	Chicago 2	ATCC 33215
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 7	Chicago 8	NCTC 11984
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 8	Concorde 3	NCTC 11985
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 9	IN-23-GI-C2	NCTC 11986
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 10	Leiden 1	NCTC 12000
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 11	-	NCTC 12179

Tabla 4.1.1.1. Continuación

CEPA BACTERIANA	DESIGNACIÓN DE LA CEPA	NCTC/DMSZ/ATCC No.
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 12	-	NCTC 12180
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 13	-	NCTC 12181
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 14	1169-MN-H	NCTC 12174
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 15	-	ATCC 35251
<i>Legionella longbeachae</i> serogroup 1	Longbeach 4	NCTC 11477
<i>Legionella longbeachae</i> serogroup 2	Tucker 1	NCTC 11530
<i>Legionella bozemanii</i> serogroup 1	WIGA	NCTC 11358
<i>Legionella bozemanii</i> serogroup 2	Toronto-3	NCTC 11975
<i>Legionella gormanii</i>	LS-13	NCTC 11401
<i>Legionella dumoffi</i>	NY-23	NCTC 11370
<i>Legionella micdadei</i>	Tatlock	NCTC 11371
<i>Legionella oakridgensis</i>	Oak Ridge 10	DSMZ ³ 21215
<i>Legionella taurinensis</i>	Turín I no 1	DSMZ 21697
<i>Legionella sainthelensis</i>	MSH-4	DSMZ 19231
<i>Legionella rubrilucens</i>	WA-270A-C2	DSMZ 11884
<i>Legionella cicinnatiensis</i>	72-OH-0	DSMZ 19233
<i>Legionella quinlivanii</i>	1442-AUS-E	NCTC 12433
<i>Legionella spirithensis</i>	MSH-g	NCTC 11990
<i>Legionella anisa</i>	WA-316-C3	DSMZ 17627

¹NCTC: National Collection of Type Cultures; ²ATCC: American Type Culture Collection; ³DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

Grupo II) 141 (35 *Legionella* género, 30 *Legionella pneumophila* (17 *L. pneumophila* sg. 1 + 13 *L. pneumophila* serogrupos 2-15), 106 no *Legionella*) aislados ambientales provenientes de 64 muestras de agua procedentes de SGS Tecnos S.A. Laboratorio de Microbiología de Medio Ambiente y Prevención (Madrid) (ver apartado 5.1. de Resultados). Las colonias aisladas se analizaron con un látex comercial según las instrucciones del fabricante (*Legionella Latex Test*, Oxoid, UK).

Grupo III) 28 aislados clínicos: 1 *Legionella pneumophila* sg. 1 Murcia y 27 aislados clínicos no *Legionella* procedentes del Hospital Neurotraumatológico de Jaén (HNTJ) (ver tabla 4.1.1.2.). Los aislados clínicos no *Legionella* fueron caracterizados por paneles bioquímicos (Microscan Walkaway, Siemens, Germany), según las instrucciones del fabricante. El aislado de *L. pneumophila* sg. 1 Murcia pertenece a la colección propia de Vircell, S.L., y procede del brote de LD ocurrido en Murcia en Julio de 2001¹⁴.

Tabla 4.1.1.2. Aislados clínicos del grupo I usados en el desarrollo del test.

CEPA BACTERIANA	DESIGNACIÓN DE LA CEPA	PROCEDENCIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico HNTJ ¹ 1	HNTJ
<i>Salmonella</i>	Aislado clínico HNTJ 2	HNTJ
<i>Proteus mirabilis</i>	Aislado clínico HNTJ 3	HNTJ
<i>Xantomonas</i>	Aislado clínico HNTJ 4	HNTJ
<i>Aeromonas</i>	Aislado clínico HNTJ 5	HNTJ
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Aislado clínico HNTJ 6	HNTJ
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aislado clínico HNTJ 7	HNTJ
<i>Escherichia coli</i>	Aislado clínico HNTJ 8	HNTJ
<i>Serratia</i>	Aislado clínico HNTJ 9	HNTJ
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Aislado clínico HNTJ 10	HNTJ
<i>Bacillus cereus</i>	Aislado clínico HNTJ 11	HNTJ
<i>Klebsiella</i>	Aislado clínico HNTJ 12	HNTJ
<i>Citrobacter</i>	Aislado clínico HNTJ 13	HNTJ
<i>Pseudomonas sp. 1</i>	Aislado clínico HNTJ 14	HNTJ
<i>Pseudomonas sp. 2</i>	Aislado clínico HNTJ 15	HNTJ
<i>Pseudomonas sp. 3</i>	Aislado clínico HNTJ 16	HNTJ
<i>Pseudomonas sp. 4</i>	Aislado clínico HNTJ 17	HNTJ
Aislado clínico <i>Pseudomonas sp. 1</i>	Aislado clínico HNTJ 18	HNTJ
Aislado clínico <i>Pseudomonas sp. 2</i>	Aislado clínico HNTJ 19	HNTJ
Aislado clínico <i>Pseudomonas sp. 3</i>	Aislado clínico HNTJ 20	HNTJ
Aislado clínico <i>Acinetobacter sp. 4</i>	Aislado clínico HNTJ 21	HNTJ
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aislado clínico HNTJ 22	HNTJ
<i>Staphylococcus viridans</i>	Aislado clínico HNTJ 23	HNTJ
<i>Haemophilus sp.</i>	Aislado clínico HNTJ 24	HNTJ
<i>Streptococcus sp.</i>	Aislado clínico HNTJ 25	HNTJ
<i>Streptococcus sp.</i>	Aislado clínico HNTJ 26	HNTJ
Aislado clínico <i>Pseudomonas sp. 4</i>	Aislado clínico HNTJ 27	HNTJ
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 Murcia	Aislado clínico Murcia	Murcia 2001

¹HNTJ: Hospital Neurotraumatológico de Jaén.

4.1.2. Reactivos Usados

Los reactivos que se han usado en el desarrollo del test se especifican en cada caso. Los más comunes se detallan en la siguiente tabla de forma resumida:

Tabla 4.1.2.1. Reactivos usados

ABREVIATURA	TAMPÓN/DISOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
BOLAS	Bolas de vidrio de 0.1 mm para romper organismos/células por agitación física	Biospec Products, Inc.
DEV	solución desarrolladora o developer	Tris 0.2 M, NaCl 0,5 M, EDTA 2%, Tween-20® 1% pH 8.5
GAM-FITC	Conjugado de Goat anti Mouse marcado con isotiocianato de fluoresceína	IgG cabra anti IgG ratón Sigma-Aldrich
GAM-HRP	Conjugado de Goat anti Mouse marcado con peroxidasa 1/6000	IgG cabra anti IgG ratón HRP Sigma-Aldrich
GAR-FITC	Conjugado de Goat anti Rabbit marcado con isotiocianato de fluoresceína	IgG cabra anti IgG conejo HRP Sigma-Aldrich
PBSBSA 0.3 %	Tampón fosfato salino pH 7.2 con albúmina de suero bovino al 0.3 %	NaCl 8 g/l, KCl 0,3 g/l, NaH ₂ PO ₄ 0.85 g/l, KH ₂ PO ₄ 0.55 g/l, BSA 3 g/l, pH 7.2
PBSBSA 1 %	Tampón fosfato salino pH 7.2 con albúmina de suero bovino al 1 %	NaCl 8 g/l, KCl 0,3 g/l, NaH ₂ PO ₄ 0.85 g/l, KH ₂ PO ₄ 0.55 g/l, BSA 10 g/l, pH 7.2
PBSc	Tampón fosfato salino pH 7.5	NaCl 8 g/l, KCl 0,3 g/l, NaH ₂ PO ₄ 0.85 g/l, KH ₂ PO ₄ 0.55 g/l, pH 7.5
PBSe	Tampón fosfato salino pH 7.2	NaCl 8 g/l, KCl 0,3 g/l, NaH ₂ PO ₄ 0.85 g/l, KH ₂ PO ₄ 0.55 g/l, pH 7.2
PEG 1%	Polietilenglicol al 1%	Polietilenglicol 10g/L
PMB	Sulfato de Polimixina-B	Sigma-Aldrich
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina	TMB ELISA Substrate NEOGEN Corporation
TMBm	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina para membranas	TMB Membrane Substrate NEOGEN Corporation
TR	Tampón de resuspensión de conjugados de oro coloidal	Borax 5 mM, BSA 0,5 % (p/v), PEG 0,025 %, pH 7.4
TSO	Tampón de secado de conjugados de oro coloidal	Borax 5 mM, BSA 1 % (p/v), Tritón X-100® 0.1 % (v/v), Tween-20® 1 % (v/v), sacarosa 6 % (p/v), pH 8

La totalidad de los Mab usados en el test han sido desarrollados en Vircell, S.L., excepto el Mab tipo LP3IIG2, que ha sido adquirido a la ATCC (ATCC, HB 8472), siendo posteriormente el hibridoma crecido y purificado en las instalaciones de Vircell, S.L.

4.1.3. Inoculación de Placas

- Agar Legionella: Gélase Legionella (LEG-F/LEG SUP-M/LEG SEL-M) de bioMérieux®, SA (Lyon, Francia) preparado según instrucciones del fabricante.
- Agar Sangre: Columbia agar with sheep blood 'plus' de Oxoid, UK.

4.1.4. Materiales para Inmunocromatografía

- Backing o Soporte: material plástico de poliestireno con bandas adhesivas protectoras de G&L.
- Bolsita Desecante: Minipax de Multisorb Technologies INC.
- Casete Plástico: de HBI Co. Ltd., Corea.

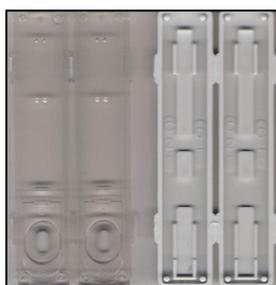


Figura 4.1.4.1. Casete plástico con parte superior transparente.

- Membrana: membrana porosa de nitrocelulosa de 4 cm de ancho y 5 micrómetros de poro de Whatman.
- Pad de Absorción: papel 10 359 992 de Whatman.
- Pads de Muestra y Conjugado: se componen del mismo material. Se trata de fibras de poliéster, de Hollingsworth & Vose.
- Papel Imprimible: etiquetas resistentes a la humedad APPLI y papel G&L brillante para impresión usado en el covertape.
- Sobre de Aluminio: de Rotek Industries, India.

4.1.5. Maquinaria e Instrumentación

Los sistemas mecánicos o automáticos e instrumentos usados en la elaboración de la inmunocromatografía para detección de *Legionella* en cultivos han sido:

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- Agitación/Calefacción:

- Agitador magnético/placa calefactora AREX de VELP Scientifica, para la preparación de tampones, hervido de *Legionella* y preparación de oro coloidal.
- Agitador circular Heidolph instruments Rotamax 120 para la realización de Western-blot y agitación de lavados de inmunofluorescencia.
- Termobloque Bio TDB-100, usado para el calentamiento/incubación de muestras.
- Vortex Rx3 de VELP Scientifica.

- Almacenamiento de Materiales para Inmunocromatografía:

- Armario Desecante Standard Adjust-A-Shelf™ Desiccator Cabinets, para conservación de materiales a humedad constante de la marca Terra Universal.



Figura 4.1.5.1. Armario desecante.

- Centrifugación:

- Centrifuga Thermo Scientific Sorvall RC 6 PLUS, para la preparación de conjugados de oro coloidal.
- Microcentrifuga Eppendorf Centrifuge 5424, para la sedimentación de suspensiones de legionellas y concentración de monoclonales.

- Cerrado de Casetes
 - Cerradora automática de casetes Assembly Roller YK1225, Shanghai Kinbio Tech Co. Ltd.
- Concentración de Monoclonales
 - Microcon Centrifugal Filter Devices MWCO 10000 de Millipore.
- Corte de Materiales:
 - Guillotina automática ZETA GSI-600 para el corte de pads.



Figura 4.1.5.2. Cortadora de materiales para inmunocromatografía.

- Corte de Tarjetas
 - Guillotina automática BIODOT CM 4000, que sirve para cortar los strips a una medida exacta, de manera reproducible y de forma regular.



Figura 4.1.5.3. Guillotina automática BIODOT CM 4000 (izquierda) y detalle de la cuchilla y rampa de recogida de strips (derecha).

- Guillotina manual DAHLE 565 para el corte de las hojas de covertape en tiras.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- Cromatografía
 - Cromatógrafo de altas presiones ÄKTA Explorer 100, GE Healthcare.
- Cubetas de Lectura en Espectrofotómetro: Starna 1 16R/100/Q/10 y Hellma 1 104B-OS 10 mm.
- Dosificación de Membranas:
 - Dispensadora automática BIODOT ZX 1000.

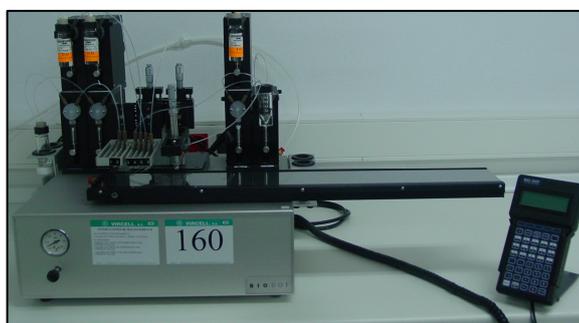


Figura 4.1.5.4. Dispensadora automática BIODOT ZX 1000

- Electroforesis y Western-Blot:
 - Cubeta de electroforesis vertical Mini PROTEAN 3 Cell de Bio-Rad.
 - Cubeta de transferencia de proteína BlueBlot wet /100 de Serva.
 - Fuente de alimentación Power Pac Basic de Bio-Rad.
 - Membrana de PVDF Immobilon-P 0.45 μm de Millipore.
- Filtración de Oro Coloidal
 - Bomba Welch 2534C-02 para la conexión al filtro del oro coloidal y hacer el vacío.
 - Stericup Filter Millipore de 0.22 μm para la filtración en el proceso de obtención del oro coloidal para eliminar nucleantes en exceso.

- Inmunofluorescencia

- Porta-objetos de vidrio para inmunofluorescencia de Immuno-Cell, Bélgica.
- Microscopio de fluorescencia de Olympus, Japón.

- Impresión

- Impresora láser HP Color LaserJet CP1215 para la impresión de los covertapes.

- Laminación de Membranas

Laminadora LCI-300 de ZETA. Esta máquina sirve para poner automáticamente la membrana en la posición exacta en la tarjeta de manera rápida y reproducible.

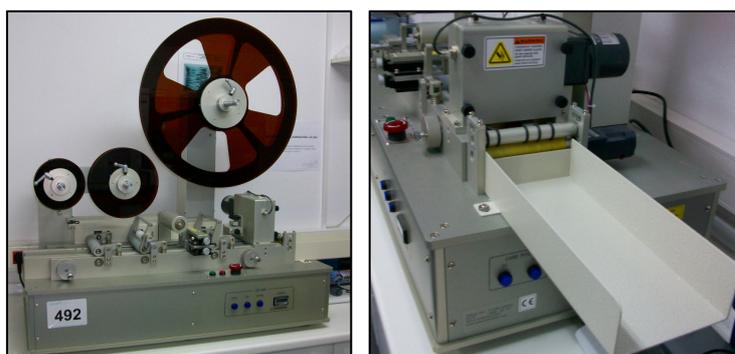


Figura 4.1.5.5. Laminadora de tarjetas (izquierda) y detalle del punto de corte y salida de las tarjetas (derecha).

- Lectura Espectrofotométrica

- Espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 Bio de Varian conectado a un ordenador con Windows NT para la medida de la absorbancia de proteínas, oro coloidal y conjugados.



Figura 4.1.5.6. Espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 Bio de Varian.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- Liofilización
 - Liofilizador modelo Telstar[®] Cryodos.

- Pipetas
 - Pipetas Finnpiptette con rango de volúmenes de 100-1000 μ l, 30-300 μ l, 3-30 μ l, 0.5-10 μ l y 0.5-5 ml, de un solo canal y multicanal.

- Secado de Membranas
 - Estufa 0-250 °C Indelab Serie 6741 A, para el secado de las membranas y pads tras el proceso de dosificación.

- Sellado de Casetes
 - Selladora con aire comprimido y calor de Strocar.

- Sonicación
 - Sonoplus GM70 de Bandelin Electronic para la homogeneización de los conjugados de oro coloidal, así como de los cultivos que se pegan a las placas de ELISA.

4.1.6. Software

El software utilizado ha consistido en:

- Escáner: Hewlett Packard Officejet Pro 1150 C.

- Medida espectrofotométrica: Cary WinUV Software.

- Programa de diseño del covertape: Macromedia FreeHand MX V 11.0.2.

- Programa de estadística: MedCalc V 12.2.1. (<http://www.medcalc.org/>).

- Programa estadístico de tratamiento de datos: Clinical Research Calculators de VassarStats: website for statistical computation (<http://vassarstats.net/>).

- Programa de lectura fotográfica: Microsoft Photo Editor V 3.0.1.
- Sistema operativo: Windows Vista™ Home Premium.

4.2. Métodos

4.2.1. Inoculación de placas

Las muestras de colecciones de referencia (grupo I) fueron sembradas en el laboratorio a partir de las cepas conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un asa de siembra estéril mediante la técnica de inoculación por estrías, para conseguir el aislamiento de las colonias en agar BCYE, y se incubaron durante cinco días a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de CO_2 . Los aislados ambientales (grupo II) fueron obtenidos por SGS Tecnos S.A. Laboratorio de Microbiología de Medio Ambiente y Prevención (Madrid), donde se procesaron e inocularon según la normativa española⁹⁴. Las muestras no *Legionella* del grupo de aislados clínicos (grupo III) se cultivaron en agar sangre, mientras que el aislado de *L. pneumophila* sg. 1 Murcia se procesó como el grupo I.

4.2.2. Recogida de las Colonias de las Placas y Preparación a McFarland 1

Para la valoración de las colonias, éstas se recogieron en la proporción 1 colonia/ 100 μl de medio de reacción y se agitaron en un vortex para posteriormente ser analizadas según el método o prueba correspondiente a realizar.

Para la preparación de suspensiones de colonias, éstas se recogieron en la proporción de 1 colonia/ 100 μl de PBSc. Las suspensiones así obtenidas se hirvieron durante 20 minutos en un baño para su inactivación. A continuación se midieron en el espectrofotómetro a una absorbancia de 600 nanómetros (A600). La A600 se ajustó con PBSc a 0.25, correspondiendo a 1 en la escala de McFarland (McF)^{133, 134}, para que todas las suspensiones estuviesen en las mismas condiciones para su evaluación. Cuando fue necesario se prepararon otras A600 (McF2~0.4-0.5, McF4~0.6-0.7).

4.2.3. Desarrollo del Test

4.2.3.1. Preparación de Anticuerpos Monoclonales y Línea Control

La preparación de los Mab se ha realizado por inmunización en ratones con los antígenos LPPA y LPS (procedentes de Vircell, S.L. Resultados no publicados presentados en parte en la 19th Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* Infections¹³⁵). En el caso de la línea control se ha usado una proteína comercial anti ratón.

4.2.3.1.1. Preparación de Anticuerpos Monoclonales

4.2.3.1.1.1. Fusión

Para la obtención de los Mab se debe realizar un proceso de inmunización en ratones para producir células esplenocíticas que posteriormente se fusionan con células mielocíticas para obtener un hibridoma. De la purificación de éste se podrá obtener el Mab deseado. Este proceso lo realizó el departamento de Inmunología de la empresa Vircell, S.L., para la obtención de Mab específicos contra epítomos de los ya mencionados LPPA y LPS-1. El proceso llevado a cabo se explica en los anexos 1 a 3 de ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS.

Los Mab seleccionados se numeraron como A, B, C, D, etc. y son los que se usan en este trabajo.

4.2.3.1.2. Purificación de Hibridomas de Anticuerpos Monoclonales

Para la purificación de los Mab, se ha llevado a cabo una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) en un cromatógrafo de altas presiones (ÄKTA Explorer 100, GE Healthcare) con una columna Hi-Trap de Proteína-A de 1 ml.

Un volumen de 50 ml de hibridoma de Mab filtrado por 0.22 µm se introduce en el cromatógrafo a 0.5 ml/minuto (flujo downflow) y se lava con 15 volúmenes de columna con un tampón Glicina/NaCl (IgG1) o TRIS (otras IgG). La elución depende de si es por gradiente o isocrática y se realiza con tampones citrato 0'1M pH 6, 5 y 4 para el primer caso, o con tampones citrato 0.1M pH 3 para el segundo, con 10 volúmenes de columna, obteniendo

finalmente fracciones de 0.5 ml. Para conservar la columna se lava posteriormente con NaOH/NaCl y tras lavar con agua se almacena en etanol al 20% (v/v) con azida sódica.

4.2.3.1.3. Procesado de las Fracciones de Purificación de Anticuerpos Monoclonales

Las eluciones obtenidas en la columna cromatográfica (HPLC) para cada Mab se midieron a una absorbancia de 280 nm (A280) y a A320. Se unieron en función de la A280 y la agregación ((A320/A280) x100) y su posición en el cromatograma. Las fracciones (F) del pico se unieron entre sí formando una fracción (F1) y con el resto de eluciones se creó otra fracción (F2). Si no fue necesario tener más de una fracción, se unieron todas las eluciones seleccionadas (F1+F2). Las eluciones con muy baja A280 y alta agregación fueron descartadas.

La agregación se ha calculado como se indica en el párrafo anterior. Al pool de fracciones obtenido se le ha medido la A280 y A320 nuevamente y se ha calculado la concentración y agregación tras filtrar por 0'45 µm de poro y añadir azida sódica al 0.1% (p/v).

La A280 se relaciona directamente con la concentración de la proteína a través de la absorptividad molar (o factor de extinción molar), ϵ , en $\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, a través de la ecuación de la Ley de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon bc$$

donde A es absorbancia a 280 nm, b es el paso de luz de la cubeta del espectrofotómetro, y c es la concentración en g/L ¹³⁶. Para el caso de los anticuerpos o inmunoglobulinas (MW ~150000 (g mol^{-1})), ϵ tiene un valor de $\sim 210000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ¹³⁷, por lo que al tener 1 cm la cubeta de medida de paso de luz (Starna 1 16R/100/Q/10) y aplicando la multiplicación por el peso molecular, queda un valor de ϵ corregido de: 1.4 L g^{-1} , que empleado en la fórmula anterior proporcionó el valor de concentración en g/L o mg/ml .

Estos Mab obtenidos se analizaron a continuación por ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (ver punto 4.2.3.2. ELISA) con placa de LPPA, *L. pneumophila* sg. 1 o *L. pneumophila* sg. 5, según corresponda, para comprobar la pureza del mismo y su actividad. El criterio para aceptar el Mab se basó en obtener el mismo título a ambas concentraciones, lo que indicaría la pureza del mismo. Los que no mantuvieron el

título a ambas concentraciones fueron desechados. Los que sí, se titularon para línea o conjugado.

4.2.3.1.4. Preparación de la Línea Control

La línea control del test consiste en una proteína comercial IgG de cabra anti ratón (IgG goat anti Mouse, Sigma M2650) dosificada en PBSe a 1 mg/ml. Cuando los conjugados con los Mab de ratón llegan a ella, se produce una reacción inmunológica entre ambos, apareciendo una línea coloreada, lo que indica que la inmunocromatografía ha funcionado adecuadamente.

4.2.3.2. ELISA

Para los ensayos de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) se han sensibilizado placas de 96 pocillos de poliestireno (NUNC, Dinamarca) con el antígeno de LPPA, o la cepa de *Legionella* correspondiente (*L. pneumophila* sg. 1 y *L. pneumophila* sg. 5). El procedimiento en esencia ha sido:

- Para el antígeno de LPPA, se ha diluido éste en PBSe y se han añadido 100 µl a cada pocillo de la placa, dejándola ésta en una cámara húmeda de incubación durante toda una noche. Al día siguiente se han lavado las placas con PBSe con Tween[®]-20 al 0.1% y se han añadido 300 µl de bloqueante con BSA, que se ha dejado actuar 2 horas. Se vacía el bloqueante y se deja secar a 37 °C durante 4 horas y una vez terminadas se guardan a 4 °C en ausencia de humedad.
- Para los cultivos de *Legionella*, una vez han sido inactivados por calor (hervir 20 minutos), se ha medido la A600 en el espectro y se ha preparado el cultivo a una A600 de 0'5 en PBSe. Se ha medido para comprobar que es correcta y se ha diluido 1/200 y sonicado 30 segundos a 50 ciclos y 75% de potencia. Se han añadido 100 µl a los pocillos de las placas y se ha seguido el mismo proceso que en el caso anterior.

En la elaboración del ELISA, se añaden 100 µl de Mab a analizar a la concentración de 1 y 0.1 µg/ml en PBSBSA 1% y se incuba durante 45 minutos a 37 °C. Tras lavar la placa con PBSe con Tween[®]-20 al 0.1% se añade un conjugado de GAM-HRP 1/6000 y se deja incubar durante 30 minutos. Tras un nuevo lavado se adiciona TMB que dará color a los pocillos en los que haya señal positiva y a continuación H₂SO₄ 0.5 M como agente de parada de la

reacción, para finalmente leer los resultados en un lector con filtros de 450/620 nm (Whittakker Bioproducts EIA Reader 400 FW). Éstos se llevaron a una hoja de cálculo para su manejo.

4.2.3.3. Western-Blot

Para la realización del Western-blot se han cargado en un gel SDS-Page cepas *de L. bozemanii* serogrupos 1 y 2, *L. gormanii* y *L. longbeachae* sg. 1 a una A600: 0.25 y posteriormente se han transferido a una membrana de PVDF. Éstas se bloquearon con leche al 5% (p/v) en PBSe con Tween®-20 al 0.1%, y se incubaron en agitación circular con los Mab de LPPA diluidos 1/400 en la misma solución usada para el bloqueo. Se lavó posteriormente dos veces durante 10 minutos con PBSe con Tween®-20 al 0.1%, y se añadió un conjugado GAM-HRP 1/6000. Posteriormente se repitió el paso de lavado y se reveló con TMBm hasta la aparición de señal.

4.2.3.4. Inmunofluorescencia

Para la realización de la técnica de inmunofluorescencia, se han preparado las diferentes cepas bacterianas a usar a una concentración de aproximadamente 800 bacterias por campo en *Yolk Sac* al 0.5 %. Se han puesto 5 µl de cada dilución por pocillo del portaobjetos y se ha dejado secar durante una hora para a continuación fijar con acetona por inmersión durante 30 minutos. Tras el secado, se almacenaron a 4 °C.

Para llevar a cabo la reacción, se han puesto 20 µl de los Mab o policlonales a analizar a una concentración de 10 µg/ml en PBSBSA 0.3% en el pocillo correspondiente durante 30 minutos en una cámara húmeda y a 37 °C. A continuación se han realizado dos lavados de 10 minutos con PBSe y se ha añadido al pocillo conjugado de GAM-FITC o GAR-FITC (según el caso) diluido 1/100 con Evans blue 1% (p/v) diluido 1/1000, incubando y lavando nuevamente como en el paso anterior. Tras lavar con agua destilada se han secado y leído con ayuda de glicerina tamponada a pH alcalino en el microscopio de fluorescencia.

4.2.3.5. Preparación del Strip. Dosificación de Tarjetas

La membrana de nitrocelulosa se ensambló en las tarjetas de poliestireno mediante una laminadora de tarjetas, siendo estas conservadas a continuación en un armario desecante con humedad constante.

Los Mab usados se prepararon como punto de partida a 1 mg/ml y se les añadió metanol al 5% (v/v) justo antes del momento de ser dosificados con una dispensadora de líneas. Cuando fue necesario concentrar, se realizó por centrifugación a 16400xg y se recogió el concentrado a 1000xg en concentradores para centrífuga (Microcon Centrifugal Filter Devices, Millipore) según las instrucciones del fabricante. Si por el contrario fue necesario diluir, se realizó en el medio en que se encontraban.

Los elementos fundamentales de la dispensadora se muestran en la figura 4.2.3.5.1. Se puede observar un reservorio con los Mab a dosificar (muestra) que es recogido por una bomba, que lo extrae y lo lanza hacia los conductos de plástico (tubos de alimentación y dispensación) cuya salida se encuentra en el cabezal de dispensación. La tarjeta con la membrana se coloca en un soporte móvil, de manera que al desplazar la membrana bajo el cabezal, éste va dibujando una línea que se difunde por capilaridad.

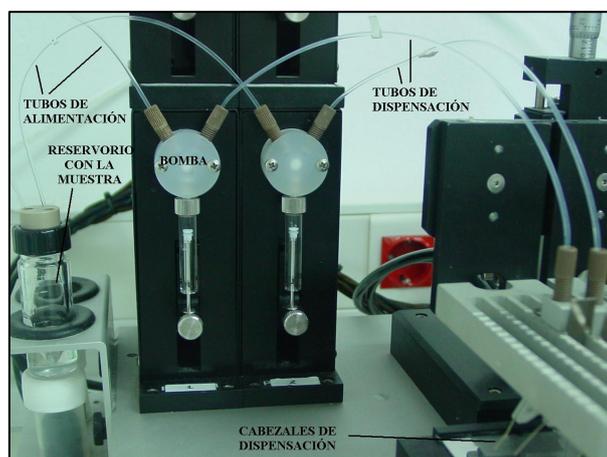


Figura 4.2.3.5.1. Elementos fundamentales de la dispensadora.

Las condiciones de dosificación para los Mab de *Legionella* han sido 0.6 μ l/cm y 300 mm de longitud. Las tarjetas dosificadas se secaron en una estufa durante 10 minutos a 50°C y posteriormente, tras cubrir las membranas con bandas protectoras que evitasen el contacto

directo con la luz, se guardaron en un armario desecante. Este proceso fue el mismo para todas las dosificaciones realizadas.

4.2.3.6. Preparación de Oro Coloidal

Para la preparación del oro coloidal se partió de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sólido. Se pesó en una balanza analítica y se le añadió agua apirógena para obtener una disolución al 20% (p/v). A 1 g de citrato trisódico anhidro se le añadieron 500 ml de agua apirógena. A esta última disolución se le adicionó 2.5 ml de la solución de hidrocloreuro de oro al 20 % (p/v) y se comenzó a calentar hasta ebullición, se paró la agitación y se dejó 10 minutos en una placa calefactora. Se produce un cambio de color del amarillo al negro y posteriormente al rojo. La disolución obtenida se filtró con filtros de nitrocelulosa de 0.22 μm de poro y se diluyó cinco veces en agua apirógena para su posterior caracterización espectrofotométrica, donde se recogieron los valores de A500, A540 y A575, y el valor de λ máxima para conocer la monodispersión del coloide.

4.2.3.7. Determinación de la Mínima Concentración que Protege al Oro (MPC)

Para calcular la mínima concentración de Mab que protege al oro (MPC) y lo estabiliza, se ha realizado un cribado con oro diluido 1/2 a pH 5, 7 y 9. A un mililitro de la condición elegida se le ha añadido 0.1 ml de proteína a concentraciones de 0 a 14 $\mu\text{g/ml}$ diluida en el mismo tampón usado para diluir el oro y a continuación se ha añadido 0.1 ml de NaCl 10% (p/v) para parar la reacción y se ha dejado actuar 10 minutos. El blanco se obtuvo de igual forma con 1 ml de oro, 0.1 ml de tampón usado en cada caso y 0.1 ml de agua destilada. Finalmente se ha medido la A580 para cada tubo y se ha obtenido una curva para cada pH donde se representa A580 frente a la concentración de proteína en $\mu\text{g/ml}$.

4.2.3.8. Conjugación de Anticuerpos Monoclonales al Oro Coloidal

Con las condiciones obtenidas para cada Mab en el cálculo de su MPC, se ha conjugado cada uno diluyendo el oro coloidal en el tampón apropiado (finalmente pH 9 para todos los casos), a la concentración determinada y se ha dejado agitando durante 15 minutos. Tras este tiempo, se les ha añadido PEG 1% (p/v) a razón de 0.05 ml/ml de conjugado, y se ha agitado 15 minutos más. Pasado este tiempo se ha introducido el conjugado en un tubo de polipropileno y se ha centrifugado 4 veces durante 30 minutos a 31100xg, resuspendiendo los

4. MATERIALES Y MÉTODOS

conjugados en TR. Tras cada lavado se ha sonificado cada tubo durante 30 segundos a 50 ciclos y 75 % potencia y tras el último lavado se han medido en el espectro las A500, A540 y A575, así como el valor de λ máxima.

4.2.3.9. Dosificación de Pads

Para la evaluación de los conjugados se secaron en un pad de poliéster, preparando la dilución deseada (normalmente OD de 2 y 4), siendo la mitad del volumen a preparar TSO y la otra mitad del volumen una mezcla de conjugado y TR. Se dosificó manualmente para las pruebas extendiendo el volumen, y se secó durante 20 minutos a 50 °C en una estufa. En el caso de usar la dispensadora automática, se usó el cabezal con spray a una velocidad de 30 mm/segundo y una razón de 25 μ l/cm, secándose de igual forma.

Para el bloqueo de pads de muestra se hizo de igual forma, secando durante 30 minutos a 50 °C. En el caso de usar la dispensadora se usó 30 mm/segundo y una razón de 83.9 μ l/cm, secándose de igual forma.

4.2.3.10. Impresión de Covertape

La impresión de hojas de covertape e identificación del pad de absorción se realizó a color. Las hojas de covertape se cortaron con una guillotina en tiras y las hojas identificativas del pad de absorción se pegaron sobre hojas de dicho pad para igualmente cortarlas en la guillotina. Estos elementos se usaron posteriormente en el montaje del strip.

4.2.3.11. Montaje de los Strips

Se montó el pad de conjugado 2 mm sobre la membrana y el de muestra superpuesto al de conjugado solapando 1 mm sobre la membrana para que las barras de presión del casete ejercieran su acción adecuadamente. El pad de absorción se ajustó al borde inferior del strip. El covertape se colocó sobre el pad de muestra y la membrana, y se dejó reposar al menos 1 hora antes de su uso para la correcta adhesión de los componentes entre sí.

4.2.3.12. Determinación del Sistema Óptimo. Procedimientos Generales

Una vez preparados todos los Mab y conocida la concentración de cada uno se procedió a la evaluación y puesta a punto del test. En el caso de los Mab LPS-1 I y LPN sólo se dosificó la fracción denominada como F1 por ser las de más elevada concentración (estos dos Mab tienen dos fracciones porque obligatoriamente necesitaban estar presentes tanto en línea como en conjugado como se puede ver en el apartado 5.6.5. de resultados). Se dosificaron con la dispensadora a distintas concentraciones para encontrar la óptima y ésta fue la que se usó para el desarrollo (datos de titulación no mostrados).

Para llevar a cabo las reacciones, se utilizaron diferentes métodos en función de las variables a usar. El procedimiento general inicial consistió en la adición de 40 µl de muestra y 2 gotas de solución de desarrollo DEV sobre el pocillo del strip correspondiente (protocolo común de una inmunocromatografía). En el caso de no usar DEV se añadieron 90 µl directamente sobre el pocillo.

En cuanto a la incubación de las muestras, se realizó a temperatura ambiente y/o en un termobloque a la temperatura deseada.

Para la rotura física se usó una sonicación de 30 segundos con 50 ciclos al 25% de los cultivos. Cuando se usaron bolas de vidrio, éstas se agitaron con el cultivo correspondiente en un vortex y posteriormente se dejaron decantar para recoger el sobrenadante.

Cuando se analizaron cultivos de placas, éstos se recogieron con un asa de siembra estéril y se introdujeron en un vial con el medio a usar en función del experimento, agitándose a continuación. El siguiente paso, cuando así se requirió, fue la inactivación por calor mediante hervido de las suspensiones durante 20 minutos. Para el análisis de suspensiones fue necesaria la centrifugación de las muestras con una microcentrífuga a 15800xg durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se añadió la solución correspondiente y se agitó para resuspender dicho pellet.

Las principales líneas de las que debía constar el test: (género (GÉN), serogrupo 1 (SR1) y serogrupo 1 a 15 (ESP)), se estudiaron inicialmente por separado, aunque en paralelo, para una mayor facilidad y agilidad.

4.2.3.13. Preparación del Medio de Reacción

El medio final desarrollado se preparó diluyendo los componentes en agua destilada y ajustándolo a un pH de 7.2. Se prepararon alícuotas de 1 ml/vial y se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación se realizó su liofilización durante 15 horas y una vez finalizado el proceso se cerraron los viales manteniendo el vacío. Los viales liofilizados se mantienen almacenados a temperatura ambiente. Para su uso se reconstituyen con 1 ml de agua destilada y se agitan.

4.2.4. Evaluación del Test

4.2.4.1. Fundamento del Método y Protocolo de Desarrollo del Test

El procedimiento a seguir para la realización del test consiste en:

- Al tratarse de colonias vivas debe realizarse en una cabina de seguridad biológica.
- Se atemperan todos los reactivos del test.
- Se identifica cada tubo con la colonia a analizar.
- Se abren los sobres necesarios y se identifican con cada colonia a analizar.
- Se añaden 1 ml de agua destilada al medio de reacción y se agita.
- Se añaden 200 μl de medio por tubo a usar.
- Se recogen con un asa estéril dos colonias típicas de entre 1-3 mm y se resuspenden en 200 μl de medio asegurándose que todo ha quedado desprendido del asa. En el caso de suspensiones de colonias inactivadas por calor, 200 μl de éstas se centrifugan 5 minutos a 15800xg, se retira el sobrenadante y al pellet se le añaden 200 μl de medio.
- Se agita para resuspender y se deja incubar 10 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Se deja atemperar y se pipetea 90 μl para el pocillo del strip L.genus y otros 90 μl para el del strip de Lpn1/1-15.
- Se deja desarrollar el test durante 15 minutos.

- Se realiza la lectura visual tras los 15 minutos.

4.2.4.2. Lectura Visual

La positividad de las muestras se determina mediante una escala de color, en función de la intensidad de la banda obtenida con las tarjetas de lectura que poseen todos los equipos VIRapid® de Vircell, S.L. (ver figura 4.2.4.2.1.) y a la cual se ajustan los productos que se desarrollan en la empresa. La escala va desde el **0.5**, que es la intensidad cut-off de la técnica, hasta el **3** que se valora como positivo alto. Las lecturas inferiores a 0.5 se consideran un resultado negativo y por encima positivo.

En el caso de ser **intensidades cercanas al 0.5** (0.5- o 0.5-/0.5) se consideran indeterminadas. Por **debajo de 0.5 (<0.5)**, como ya se ha explicado, se tendría un resultado negativo, pero entre el 0 y el 0.5 puede aparecer algo de color, lo que se denomina como **<0.5 color**. Cuando el valor es negativo, pero no es totalmente blanco, sino que se intuye la forma de la línea, se denomina **sombra**, y aunque es negativo, indica señal visible en la línea.

Cuando la intensidad de las líneas se encuentra por encima de un valor, pero no muy alejado, se le denomina como el **valor y el símbolo +**, por ejemplo, 1+, y cuando el color es próximo a un valor, pero algo menos, se le denomina el **valor y el símbolo -**, por ejemplo, 2-. Cuando la intensidad está justo entre dos números de la tarjeta de lectura, se le denomina como **valor y símbolo + y valor y símbolo -**, por ejemplo 1+/2-.

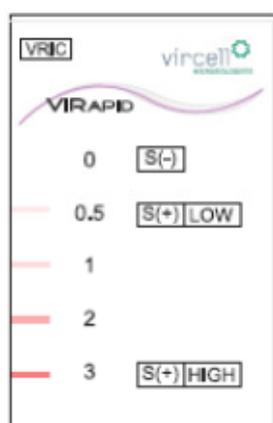


Figura 4.2.4.2.1. Tarjeta de intensidades mostrando la escala de intensidad de 0 a 3.

4.2.4.3. Determinación del Límite de Detección de la Técnica

Para determinar el límite de detección del test, se prepararon suspensiones de bacterias no inactivadas y se realizaron diluciones 1/10 seriadas de las mismas en PBSc, siendo posteriormente cultivados 10 µl de las mismas en BCYE. Dichas placas fueron incubadas durante 5 días a 35±2 °C en atmósfera de CO₂. Las colonias obtenidas se contaron. Las suspensiones se analizaron y se comprobó hasta que unidades formadoras de colonias por mililitro se detectaba señal en el test inmunocromatográfico.

4.2.4.4. Tratamiento Estadístico de los Datos

Para validar e interpretar correctamente los resultados obtenidos por el kit que se ha desarrollado, fue necesario realizar un estudio estadístico. Los valores que se deben determinar para valorar la exactitud (capacidad del clasificador de detectar correctamente una condición cuando está presente y descartarla cuando está ausente) del método son la especificidad, sensibilidad y los valores predictivos principalmente, pero también pueden considerarse por ejemplo las tasas de verosimilitud.

Las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic o Característica Operativa del Receptor)¹³⁸⁻¹⁴⁰, son una representación gráfica del rendimiento de un clasificador que proporciona visualmente la capacidad de dicho método para detectar correctamente los individuos con presencia de la condición de interés y su incapacidad para identificar los individuos del grupo de ausencia^{141, 142, 143}. Brevemente, se genera una curva que proporciona un punto de corte para los datos. Por encima de éste la respuesta del clasificador se considera positiva y por debajo negativa. Pero esto puede producir errores por posibles falsas clasificaciones de los datos. Dichos fallos generan una probabilidad de error al tomar una decisión que depende del punto de corte elegido. Estas probabilidades de error se relacionan numéricamente con la sensibilidad y la especificidad a través de la fracción de falsos positivos o de verdaderos positivos y la representación en el plano de estos porcentajes o fracciones recibe el nombre de curva ROC.

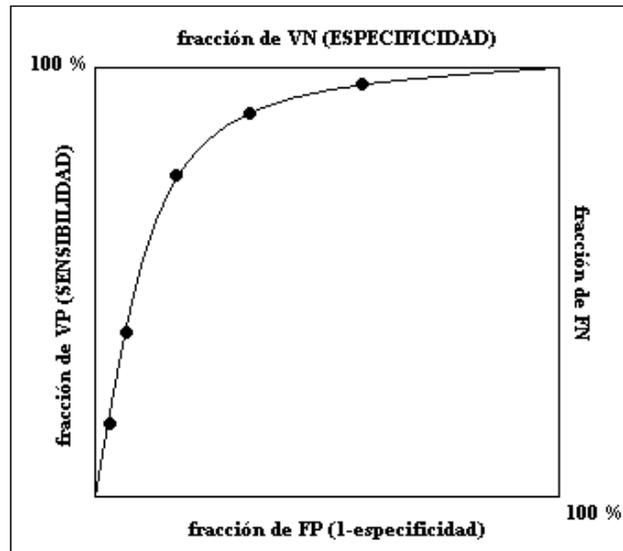


Figura 4.2.4.4.1. Representación de las fracciones de falsos positivos (FP) frente a la de verdaderos positivos (VP). Curva ROC.

La máxima exactitud del test se producirá cuando el área bajo la curva sea igual a 1, es decir, un ángulo recto que se dibuje sobre los ejes y no una curva entre los mismos¹⁴⁴. Por ello, cuanto más próximo a 1 sea el área calculada bajo la curva, más exactitud tendrá el clasificador valorado.

Esta metodología tiene aplicación en los sistemas de diagnóstico y predicción. Los cálculos y curvas se han realizado con el programa MEDCALC^{145, 146} (MedCalc Software, Acaciaaan 22, B-8400 Ostend, Belgium, <http://www.medcalc.org/>), que elabora el cálculo de estas curvas en función de los pares de valores (sensibilidad, especificidad).

A continuación se definen estos conceptos que se calcularán posteriormente para determinar la validez del test desarrollado como método de detección de *Legionella* en cultivos procedentes de muestras ambientales y humanas:

- Falsos negativos (FN): número de casos en los que está presente la condición y se da una predicción negativa de forma incorrecta.
- Falsos positivos (FP): número de casos en los que está ausente la condición y se da una predicción positiva de forma incorrecta.
- Verdaderos negativos (VN): número de casos con ausencia de la condición y a los que se les da una predicción negativa correcta.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- Verdaderos positivos (VP): número de casos con presencia de la condición y a los que se les da una predicción positiva correcta.

- Especificidad (E): probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea la ausencia de la condición de interés. Se calcula como:

$$E = \frac{VN}{FP + VN} = FVN$$

, siendo FVN la fracción de verdaderos negativos. Y siendo la FFP la fracción de falsos positivos, que se calcula como 1-E.

- Sensibilidad (S): probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea la presencia de la condición de interés. Se calcula como:

$$S = \frac{VP}{VP + FN} = FVP$$

, siendo FVP la fracción de verdaderos positivos. Y siendo la FFN la fracción de falsos negativos, que se calcula como 1-S.

- Valor predictivo negativo (VPN): probabilidad de identificar correctamente los casos negativos. Se calcula como:

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

- Valor predictivo positivo (VPP): o precisión de un clasificador. Es la probabilidad de identificar correctamente los casos positivos. Se calcula como:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

- Tasa de verosimilitud (LR): para cada tipo de respuesta del clasificador, se define como el cociente entre la probabilidad de la respuesta bajo presencia de la condición y la probabilidad de dicha respuesta bajo el estado de ausencia. Puede ser positiva

(LRP) o negativa (LRN), y se calculan como: $LRP = \frac{S}{1-E} = \frac{FVP}{FFP}$ y

$$LRN = \frac{1-S}{E} = \frac{FFN}{FVN}$$

. Los valores igual a 1 (positivos o negativos) indican que la respuesta del clasificador es igual de probable entre individuos con y sin presencia de la condición. Si es mayor de 1, indica que es más probable entre individuos con presencia de la condición. Tasa por debajo de 0'1 y por encima de 10 significarían que el clasificador es excelente, mientras que el peor resultado para el clasificador es cuando se encuentra entre 0'5 y 2.

- Exactitud (o accuracy, AC): es la probabilidad de un clasificador de predecir correctamente. Se calcula como:

$$AC = \frac{VP + VN}{N}$$

. Cuanto más cercano a 1 sea su valor, más exacto será el resultado, o a 100 en términos de tanto por ciento.

- Índice de Youden (γ): es la diferencia entre la proporción de respuestas positivas del clasificador cuando la condición está presente y la proporción de respuestas positivas cuando la condición está ausente. Se calcula como: $\gamma = S + E - 1$. Con este parámetro de puede ver si la clasificación es aleatoria. Cuando este ocurre es 0. Si la clasificación es ideal será 1.

Con estos datos pueden generarse tablas de doble entrada con el siguiente esquema^{140, 141}.

Tabla 4.2.4.4.1. Tabla de doble entrada

		PREDICCIÓN CLASIFICADOR		
		POSITIVO	NEGATIVO	
ESTADO REAL DE LA CONDICIÓN	PRESENCIA	VP ¹	FN ²	TOTAL PRESENCIA
	AUSENCIA	FP ³	VN ⁴	TOTAL AUSENCIA
		TOTAL POSITIVOS	TOTAL NEGATIVOS	TOTAL

¹VP: verdaderos positivos; ²FN: falsos negativos; ³FP: falsos positivos; ⁴VN: verdaderos negativos.

Con estas tablas de doble entrada puede verse la diagonal de aciertos (VP-VN) y la de errores (FN-FP) que nos informa del rendimiento o exactitud del clasificador en comparación con el estado real de la condición. A partir de la tabla de doble entrada podemos calcular el resto de parámetros mencionados.

4.2.4.5. Estudios de Estabilidad

4.2.4.5.1. Estabilidad de los Strips

Para el estudio de la estabilidad de los strips, éstos se incubaron a 50 °C durante una semana y se analizaron en paralelo a temperatura ambiente (TA). Así mismo, se analizó el strip tras un año a TA conservado con desecantes en ausencia de luz. Las suspensiones usadas se prepararon a McF1 y fueron: *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia, *L. pneumophila* sg. 1 Oxford, *L. bozemanii* sg. 1, *L. pneumophila* sg. 3, *Citrobacter* y *Ps. aeruginosa*. Se probaron con el método expuesto en el apartado 4.2.4.1. y a los 15 minutos se llevó a cabo la lectura visual.

4.2.4.5.2. Estabilidad del Medio

Para estudiar la estabilidad del medio preparado, viales de 1 ml de éste se liofilizaron e incubaron a 50 °C durante dos meses, analizándose al mes y a los dos meses. Un vial se reconstituyó al año y se valoró en paralelo a uno recién reconstituido del mismo lote.

Las suspensiones usadas se prepararon a McF1 y se conservaron a 4 °C. Se prepararon: *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia, *L. pneumophila* sg. 1 Oxford, *L. pneumophila* sg. 1 OLDA, *L. pneumophila* sg. 1 Camperdown, *L. pneumophila* sg. 1 Bellingham, *L. bozemanii* sg. 1, *L. gormanii*, *L. pneumophila* sg. 15, *L. pneumophila* sg. 7, *L. pneumophila* sg. 2, *Aeromonas*, *Salmonella*, *S. epidermidis*, *E. aerogenes* y *B. cereus*.

Para la evaluación se reconstituyó el vial correspondiente de medio con 1 ml de agua destilada y se homogeneizó por agitación. 200 µl de las cepas se centrifugaron durante 5 minutos a 15800xg y al pellet se le añadió la cantidad de medio correspondiente. Se agitaron e incubaron 10 minutos a 95 °C y finalmente se añadieron al test, dejando desarrollarse éste durante 15 minutos, tras los cuál se realizó la lectura visual como se indica en el apartado 4.2.4.1.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Placas inoculadas

El grupo I se compone de cepas de colección (ATCC, NCTC, DSMZ) y sólo hay una especie de *Legionella* por placa inoculada.

El grupo de mayor interés es el grupo II, porque es representativo del trabajo que se puede realizar en un laboratorio de análisis de aguas. Se muestran las placas inoculadas y la descripción de las colonias en el ANEXO 1 de ANEXO RESULTADOS. La numeración de las placas fue dada por SGS Tecnos, S.A. y así se denominó a las colonias obtenidas para su análisis. De cada placa se clasificaron las diferentes colonias por tamaño, color, tipo y textura.

El grupo III se compone de aislados clínicos. Las cepas no *Legionella* se inocularon en placas de agar sangre y se obtuvieron colonias por aislamiento. En el caso del aislado de *L. pneumophila* sg. 1 Murcia se hizo en BCYE como en el grupo I, y se obtuvo una placa con colonias de dicha cepa.

5.2. Desarrollo del Test

5.2.1. Anticuerpos Monoclonales

Tras la inmunización de los ratones y el proceso de fusión para la obtención de los Mab, se obtuvieron diferentes clones que se enumeraron con letras: A, B, C, etc. (consultar ANEXO 1 de ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS). Se determinó el isotipo de cada Mab y se creció dicho hibridoma a gran escala (ver ANEXO 2 y ANEXO 3 de ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS y el ANEXO 2 de ANEXO RESULTADOS).

Se enumeran los Mab obtenidos así como el isotipo de cada uno: LPPA A (IgG_{2a}), LPPA B (IgG₁), LPPA C (IgG₁), LPPA D (IgG₁), LPPA E (IgG₁), LPPA F (IgG₁), LPS-1 A (IgG₃), LPS-1 B (IgG₁), LPS-1 C (IgG₁), LPS-1 D (IgM), LPS-1 E (IgG₃), LPS-1 F (IgG₃), LPS-1 G (IgG₁), LPS-1 H (IgG_{2b}) y LPS-1 I (IgG₃). Para el Mab comercial adquirido a la ATCC (HB 8472TM, LP3IIG2), designado para su estudio en este trabajo como LPN, la subclase o isotipo era IgG_{2a}. Los elegidos por su actividad (ver tabla 5.2.3.1.) fueron: LPPA B, LPPA C, LPPA

5. RESULTADOS

D, LPPA E, LPS-1 A, LPS-1 E, LPS-1 F, LPS-1 H, LPS-1 I y el Mab perteneciente a la ATCC.

5.2.2. Purificación de Anticuerpos Monoclonales

Tras la purificación por la columna cromatográfica (HPLC), se obtuvieron diferentes eluciones que se unieron en función de la A280, la agregación y su posición en el cromatograma (ver apartado 4.2.3.1.3. de Materiales y Métodos).

Se obtuvieron los siguientes lotes (tabla 5.2.2.1.):

Tabla 5.2.2.1. Resultados de las medidas espectrofotométricas de Mab obtenidos y su concentración

Mab	A280 ¹	A320 ²	AG ³ (%)	[] (mg/ml) ⁴	Mab	A280	A320	AG (%)	[] (mg/ml)
LPPA B 1	0,5326	0,0089	1,7	0,3888	LPS-1 A 1	0,8773	0,0023	0,3	0,6404
LPPA B 2	0,5407	0,0102	1,9	0,3947	LPS-1 A 2	1,8560	0,0563	3,0	1,3549
LPPA B 3	0,4910	0,0182	3,7	0,3584	LPS-1 A 3	1,3537	0,0652	4,8	0,9882
LPPA B 4	0,6947	0,0496	7,1	0,5071	LPS-1 A 4	1,3334	0,0752	5,6	0,9734
LPPA B 5	0,3921	0,0130	3,3	0,2862	LPS-1 A 5	1,8840	0,0562	3,0	1,3753
LPPA B 6	0,2319	0,0073	3,1	0,1693	LPS-1 A 6	1,0625	0,0452	4,3	0,7756
LPPA B 7	0,3743	0,0168	4,5	0,2732	LPS-1 C 1	0,5968	0,0625	10,5	0,4357
LPPA B 8	0,1666	0,0072	4,3	0,1216	LPS-1 C 2	0,1462	0,0125	8,6	0,1067
LPPA B 9	0,2174	0,0073	3,4	0,1587	LPS-1 C 3	0,0988	0,0089	9,0	0,0721
LPPA B 10	0,1704	0,0687	40,3	0,1244	LPS-1 C 4	0,3271	0,0285	8,7	0,2388
LPPA C 1	0,4795	0,0710	14,8	0,3500	LPS-1 C 5	0,1365	0,0211	15,5	0,0996
LPPA C 2	0,3449	0,0901	26,1	0,2518	LPS-1 C 6	0,2425	0,0422	17,4	0,1770
LPPA C 3	0,3763	0,0138	3,7	0,2747	LPS-1 C 7	0,0910	0,0147	16,2	0,0664
LPPA C 4	0,2314	0,0127	5,5	0,1689	LPS-1 C 8	0,0916	0,0062	6,8	0,0669
LPPA C 5	0,2158	0,0259	12,0	0,1575	LPS-1 E 1	2,4300	0,0857	3,5	1,7739
LPPA C 6	0,3032	0,0185	6,1	0,2213	LPS-1 E 2	3,1779	0,1250	3,9	2,3199
LPPA C 7	0,4906	0,0245	5,0	0,3581	LPS-1 E 3	3,0260	0,1756	5,8	2,2090
LPPA C 8	0,3417	0,0155	4,5	0,2494	LPS-1 E 4	2,9560	0,1012	3,4	2,1579
LPPA C 9	0,4164	0,0229	5,5	0,3040	LPS-1 F 1	1,4723	0,0254	1,7	1,0748
LPPA C 10	0,5230	0,0513	9,8	0,3818	LPS-1 F 2	0,8349	0,0089	1,1	0,6095
LPPA C 11	0,3940	0,1042	26,4	0,2876	LPS-1 F 3	0,9985	0,0065	0,7	0,7289
LPPA C 12	0,4038	0,1239	30,7	0,2948	LPS-1 F 4	1,1600	0,0058	0,5	0,8468
LPPA C 13	0,2757	0,0142	5,2	0,2013	LPS-1 F 5	0,9112	0,0085	0,9	0,6652
LPPA C 14	0,3387	0,1263	37,3	0,2473	LPS-1 H 1	0,4789	0,0512	10,7	0,3496
LPPA C 15	0,3888	0,1281	32,9	0,2838	LPS-1 H 2	0,2013	0,0338	16,8	0,1469
LPPA C 16	0,2676	0,0908	33,9	0,1953	LPS-1 H 3	2,0438	0,0516	2,5	1,4920
LPPA C 17	0,2951	0,1111	37,6	0,2154	LPS-1 H 4	2,1065	0,0451	2,1	1,5377
LPPA C 18	0,3470	0,1404	40,5	0,2533	LPS-1 I F1 1	1,0599	0,0292	2,8	0,7737

Tabla 5.2.2.1. Continuación

Mab	A280 ¹	A320 ²	AG ³ (%)	[] (mg/ml) ⁴	Mab	A280	A320	AG (%)	[] (mg/ml)
LPPA C 19	0,1258	0,0414	32,9	0,0918	LPS-1 I F1 2	1,3678	0,0387	2,8	0,9985
LPPA D 1	0,2392	0,0125	5,2	0,1746	LPS-1 I F1 3	1,0423	0,0384	3,7	0,7609
LPPA D 2	0,3889	0,0057	1,5	0,2839	LPS-1 I F2 1	0,4670	0,0221	4,7	0,3409
LPPA D 3	0,2774	0,0256	9,2	0,2025	LPS-1 I F2 2	0,2341	0,0264	11,3	0,1709
LPPA D 4	0,4201	0,0395	9,4	0,3067	LPS-1 I F2 3	0,4787	0,0304	6,4	0,3495
LPPA D 5	0,2742	0,0210	7,7	0,2002	LPS-1 I F2 4	0,3503	0,0229	6,5	0,2557
LPPA D 6	0,3171	0,0154	4,9	0,2315	LPS-1 I F3 1	1,5216	0,0667	4,4	1,1108
LPPA D 7	0,2426	0,0088	3,6	0,1771	LPN F1 1	2,9710	0,0423	1,4	2,1688
LPPA E 1	1,1850	0,0111	0,9	0,8651	LPN F1 2	2,4750	0,0344	1,4	1,8068
LPPA E 2	0,3688	0,0356	9,7	0,2692	LPN F1 3	2,7530	0,0433	1,6	2,0097
LPPA E 3	0,5724	0,0324	5,7	0,4179	LPN F1 4	1,8520	0,0326	1,8	1,3520
LPPA E 4	0,3466	0,0083	2,4	0,2530	LPN F1 5	1,5662	0,0426	2,7	1,1433
LPPA E 5	0,4603	0,0312	6,8	0,3360	LPN F2 1	0,3475	0,0235	6,8	0,2537
LPPA E 6	0,6334	0,0161	2,5	0,4624	LPN F2 2	0,2953	0,0198	6,7	0,2156
LPPA E 7	0,2422	0,1181	48,8	0,1768	LPN F2 3	0,4389	0,0288	6,6	0,3204
LPPA E 8	0,3688	0,0250	6,8	0,2692	LPN F2 4	0,2719	0,0143	5,3	0,1985
LPPA E 9	0,2934	0,0075	2,6	0,2142	LPN F2 5	0,3995	0,0236	5,9	0,2916
LPPA E 10	0,1005	0,0532	52,9	0,0734					

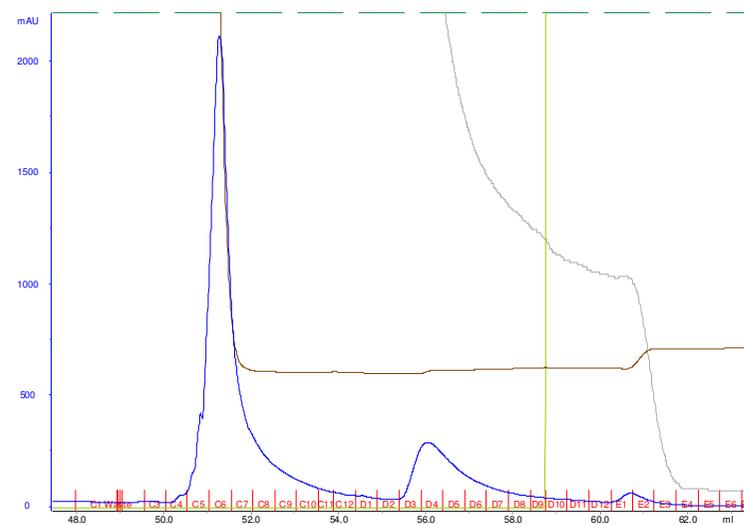
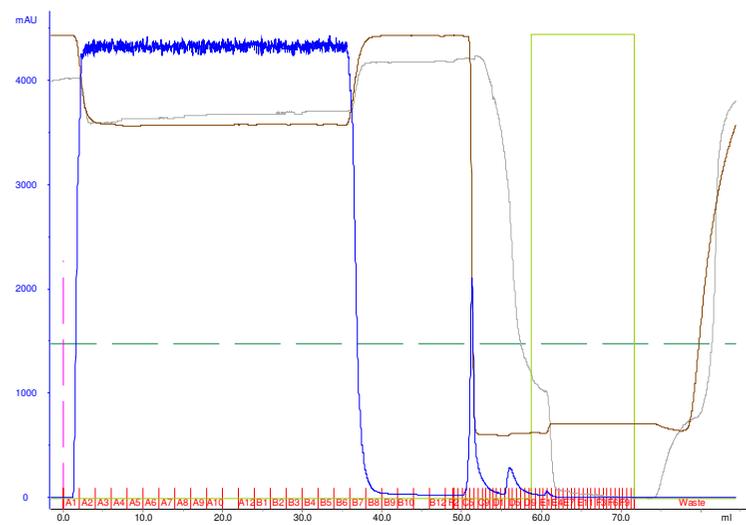
¹A280: absorbancia a 280 nm; ²A320: absorbancia a 320 nm; ³AG: agregación; ⁴[] (mg/ml): concentración en miligramos/mililitro.

Los cromatogramas obtenidos en la purificación por HPLC de los Mab, en función del isotipo de IgG, se muestran en la figura 5.2.2.1. Sólo se presenta un ejemplo de cada tipo de Mab producido por el elevado número de lotes obtenidos.

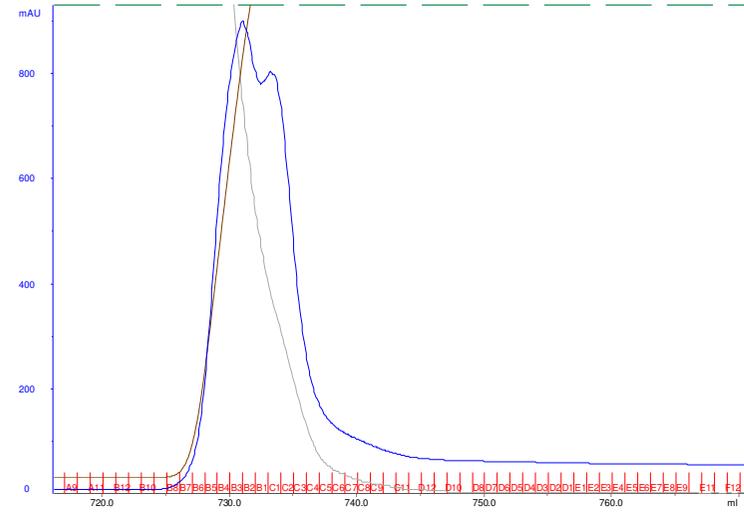
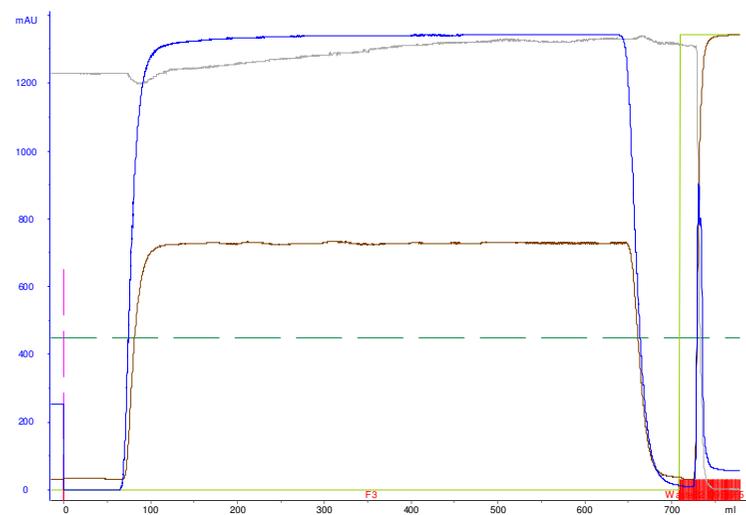
Se puede ver el tipo de cromatograma (izquierda) y un detalle del pico (derecha). Las líneas azules representan la A280 que se cuantifica en el eje de ordenadas. Las barras rojas del eje de abscisas señalan las eluciones correspondientes a esa posición (A1, A2, etc.). Los trazos grises simbolizan el cambio en el pH (al ir variando el pH se produce la elución de la/las especie/s presentes y se obtienen por tanto diferentes picos). Las líneas marrones indican la variación en la conductividad de la muestra en el proceso de purificación y, por último, las verdes representan los gradientes de concentración de sales de los tampones usados en la cromatografía.

5. RESULTADOS

TIPO IgG₁ (LPPAB, LPPAC, LPPAD, LPPAE, LPS-1 C)



TIPO IgG_{2a} (LPN)



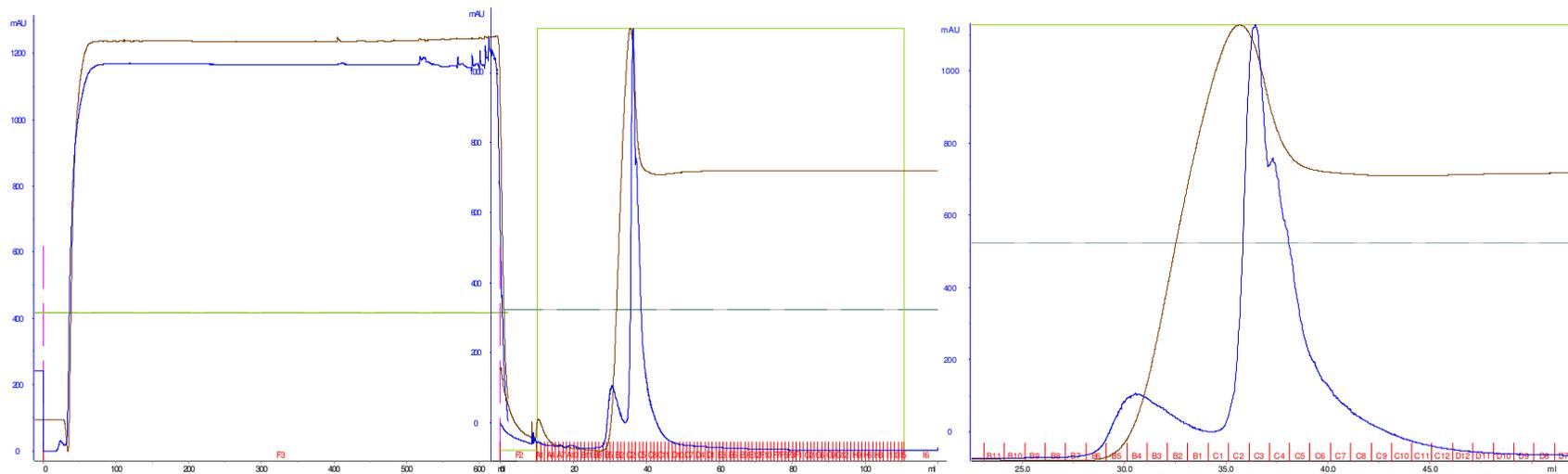
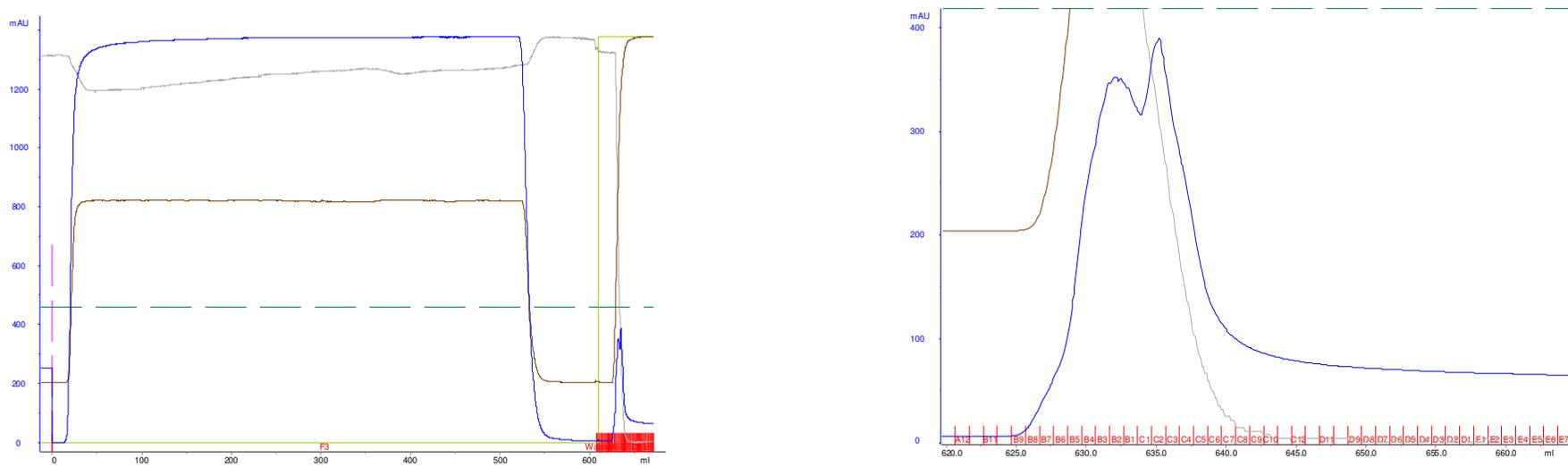
TIPO IgG_{2b} (LPS-1 H)**TIPO IgG₃ (LPS-1 A, LPS-1 E, LPS-1F, LPS-1 D)**

Figura 5.2.2.1. Cromatogramas obtenidos para la purificación de hibridomas por HPLC para cada tipo de Mab

5. RESULTADOS

5.2.3. ELISA para la Comprobación de la Actividad de los Anticuerpos Monoclonales

La actividad de los Mab purificados se analizó por la técnica de ELISA con placas sensibilizadas con antígeno de LPPA o cultivos de *L. pneumophila* sg. 1 y *L. pneumophila* sg. 5 (ver apartado 4.2.3.2.), a las concentraciones de 1 y 0.1 µg/ml diluidos en PBSBSA 1%. Este medio se utilizó como control negativo en los ensayos de ELISA. El criterio de selección se basó en resultados previos en Vircell, S.L. con otros Mab desarrollados (resultados no mostrados) y consistió en que debían de presentar alta actividad en el ensayo de ELISA y que la absorbancia obtenida fuese similar en ambas concentraciones probadas.

Tabla 5.2.3.1. Absorbancias de los ensayos de ELISA para los Mab a 1 y 0.1 µg/ml, concentración (mg/ml) y aceptación o rechazo de los diferentes lotes de Mab obtenidos

Mab	[] (mg/ml) ¹	Abs. ² ELISA 1 µg/ml	Abs. ELISA 0,1 µg/ml	ACEPTAR	Mab	[] (mg/ml)	Abs. ELISA 1 µg/ml	Abs. ELISA 0,1 µg/ml	ACEPTAR
LPPA B 1	0,3888	4,430	3,700	SI	LPS-1 A 1	0,6404	4,420	4,440	SI
LPPA B 2	0,3947	4,430	4,050	SI	LPS-1 A 2	1,3549	4,421	3,635	SI
LPPA B 3	0,3584	3,910	0,910	NO	LPS-1 A 3	0,9882	4,427	4,436	SI
LPPA B 4	0,5071	3,690	3,970	SI	LPS-1 A 4	0,9734	4,425	4,425	SI
LPPA B 5	0,2862	4,031	4,446	SI	LPS-1 A 5	1,3753	4,126	4,440	SI
LPPA B 6	0,1693	4,442	0,761	NO	LPS-1 A 6	0,7756	4,421	4,436	SI
LPPA B 7	0,2732	3,700	3,801	SI	LPS-1 C 1	0,4357	0,301	0,086	NO
LPPA B 8	0,1216	0,788	0,096	NO	LPS-1 C 2	0,1067	1,038	0,126	NO
LPPA B 9	0,1587	0,480	0,062	NO	LPS-1 C 3	0,0721	0,982	0,241	NO
LPPA B 10	0,1244	1,424	0,173	NO	LPS-1 C 4	0,2388	0,861	0,151	NO
LPPA C 1	0,3500	2,100	0,270	NO	LPS-1 C 5	0,0996	0,158	0,030	NO
LPPA C 2	0,2518	3,510	2,740	SI	LPS-1 C 6	0,1770	2,532	0,316	NO
LPPA C 3	0,2747	3,690	3,710	SI	LPS-1 C 7	0,0664	1,676	0,786	NO
LPPA C 4	0,1689	3,693	3,454	SI	LPS-1 C 8	0,0669	0,972	0,697	NO
LPPA C 5	0,1575	4,422	3,745	SI	LPS-1 E 1	1,7739	4,416	4,264	SI
LPPA C 6	0,2213	4,412	4,434	SI	LPS-1 E 2	2,3199	4,416	4,411	SI
LPPA C 7	0,3581	4,425	4,443	SI	LPS-1 E 3	2,2090	4,127	4,438	SI
LPPA C 8	0,2494	4,419	4,445	SI	LPS-1 E 4	2,1579	4,427	4,428	SI
LPPA C 9	0,3040	4,121	4,432	SI	LPS-1 F 1	1,0748	4,423	4,437	SI
LPPA C 10	0,3818	4,232	4,140	SI	LPS-1 F 2	0,6095	4,427	2,404	SI
LPPA C 11	0,2876	4,413	2,657	SI	LPS-1 F 3	0,7289	3,652	4,440	SI
LPPA C 12	0,2948	4,420	3,391	SI	LPS-1 F 4	0,8468	4,427	4,432	SI
LPPA C 13	0,2013	4,419	0,935	NO	LPS-1 F 5	0,6652	4,425	4,135	SI
LPPA C 14	0,2473	0,998	0,158	NO	LPS-1 H 1	0,3496	9,999	9,999	SI
LPPA C 15	0,2838	1,173	0,131	NO	LPS-1 H 2	0,1469	9,999	9,999	SI

Tabla 5.2.3.1. Continuación

Mab	[] (mg/ml) ¹	Abs. ² ELISA 1 µg/ml	Abs. ELISA 0,1 µg/ml	ACEPTAR	Mab	[] (mg/ml)	Abs. ELISA 1 µg/ml	Abs. ELISA 0,1 µg/ml	ACEPTAR
LPPA C 16	0,1953	0,756	0,096	NO	LPS-1 H 3	1,4920	3,953	4,428	SI
LPPA C 17	0,2154	0,471	0,065	NO	LPS-1 H 4	1,5377	4,253	4,423	SI
LPPA C 18	0,2533	0,479	0,070	NO	LPS-1 I F1 1	0,7737	3,874	4,427	SI
LPPA C 19	0,0918	0,752	0,091	NO	LPS-1 I F1 2	0,9985	4,426	4,429	SI
LPPA D 1	0,1746	4,440	1,200	SI	LPS-1 I F1 3	0,7609	3,683	4,427	SI
LPPA D 2	0,2839	4,140	0,900	NO	LPS-1 I F2 1	0,3409	4,118	3,734	SI
LPPA D 3	0,2025	3,530	2,100	SI	LPS-1 I F2 2	0,1709	4,142	4,433	SI
LPPA D 4	0,3067	3,700	2,020	SI	LPS-1 I F2 3	0,3495	3,881	4,421	SI
LPPA D 5	0,2002	3,659	0,767	NO	LPS-1 I F2 4	0,2557	4,130	4,260	SI
LPPA D 6	0,2315	4,033	1,641	SI	LPS-1 I F3 1	1,1108	4,243	4,424	SI
LPPA D 7	0,1771	3,566	0,610	NO	LPN F1 1	2,1688	1,188	0,817	SI
LPPA E 1	0,8651	4,420	4,050	SI	LPN F1 2	1,8068	1,243	0,873	SI
LPPA E 2	0,2692	3,590	1,880	SI	LPN F1 3	2,0097	1,269	0,843	SI
LPPA E 3	0,4179	4,423	4,266	SI	LPN F1 4	1,3520	1,314	0,849	SI
LPPA E 4	0,2530	4,109	4,427	SI	LPN F1 5	1,1433	1,236	0,831	SI
LPPA E 5	0,3360	4,427	4,401	SI	LPN F2 1	0,2537	1,099	0,725	SI
LPPA E 6	0,4624	4,428	4,432	SI	LPN F2 2	0,2156	1,328	0,898	SI
LPPA E 7	0,1768	3,693	1,619	SI	LPN F2 3	0,3204	1,275	0,904	SI
LPPA E 8	0,2692	3,735	2,136	SI	LPN F2 4	0,1985	1,300	0,873	SI
LPPA E 9	0,2142	3,448	0,537	NO	LPN F2 5	0,2916	1,104	0,744	SI
LPPA E 10	0,0734	2,753	0,417	NO					

¹[] (mg/ml): concentración en miligramos/mililitro; ²Abs.: absorbancia.

5.2.4. Unión de Lotes de Anticuerpos Monoclonales

Los Mab obtenidos y analizados por ELISA que mantuvieron la actividad, se unieron para la obtención de un único lote final de cada Mab. Los valores de concentración finales se muestran en la tabla 5.2.4.1.

Tabla 5.2.4.1. Valores finales de concentración tras la unión de lotes de Mab obtenidos

	A280 ¹	A320 ²	AG ³ (%)	[] (mg/ml) ⁴
LPPA B	0,4440	0,0117	2,6	0,3241
LPPA C	0,3216	0,0117	3,6	0,2348
LPPA D	0,3019	0,0049	1,6	0,2204
LPPA E	0,3550	0,0135	3,8	0,2592
LPS-1 A	1,5170	0,0420	2,8	1,1074
LPS-1 E	3,3470	0,0160	0,5	2,4433

Tabla 5.2.4.1. Continuación

	A280 ¹	A320 ²	AG ³ (%)	[] (mg/ml) ⁴
LPS-1 F	1,1780	0,0570	4,8	0,8599
LPS-1 H	2,6780	0,3540	13,2	1,9549
LPS-1 I F1	1,6340	0,1080	6,6	1,1928
LPS-1 I F2	0,3597	0,0297	8,3	0,2626
LPN F1	3,0350	0,2220	7,3	2,2156
LPN F2	0,2953	0,0262	8,9	0,2156

¹A280: absorbancia a 280 nm; ²A320: absorbancia a 320 nm; ³AG: agregación;

⁴[] (mg/ml): concentración en miligramos/mililitro.

5.3. Oro coloidal

El oro coloidal citrato se caracterizó espectrofotométricamente y se obtuvieron los parámetros que se reflejan en las tablas 5.3.1. y 5.3.2., y la curva de absorbancia-longitud de onda (λ) que se muestra en la figura 5.3.1.:

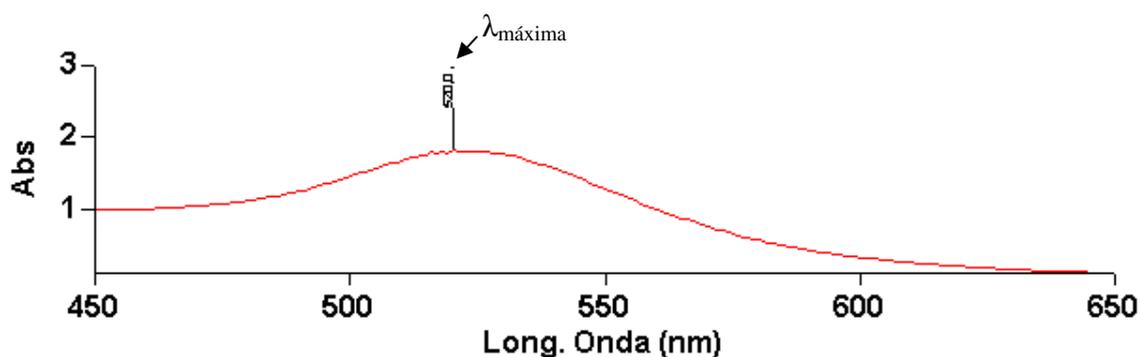


Figura 5.3.1. Curva de absorbancia-longitud de onda (λ) (en un rango de 450 a 650 nm) del oro coloidal preparado. El parámetro $\lambda_{\text{máxima}}$ se indica en la curva como el valor de longitud de onda al que se produce la máxima absorbancia.

Tabla 5.3.1. Tabla de pares absorbancia-longitud de onda del oro coloidal preparado (se marcan en azul los parámetros que caracterizan al oro coloidal)

Long. Onda (nm) ¹	Abs ²	Long. Onda (nm)	Abs	Long. Onda (nm)	Abs
650,0	0,115	583,0	0,526	516,0	1,799
649,0	0,118	582,1	0,542	515,0	1,761
648,0	0,119	581,0	0,559	514,0	1,754
647,0	0,121	580,0	0,576	512,9	1,730
645,9	0,124	578,9	0,594	512,0	1,716
645,1	0,126	578,1	0,605	511,0	1,705
644,0	0,129	577,0	0,622	510,1	1,679
643,0	0,132	576,0	0,641	509,0	1,659
642,0	0,133	574,9	0,664	507,9	1,641
641,0	0,136	574,0	0,680	507,0	1,611
639,9	0,140	573,0	0,700	506,0	1,600
639,1	0,141	571,9	0,720	505,1	1,581
638,0	0,144	571,0	0,736	504,0	1,553
637,0	0,146	570,0	0,759	502,9	1,531
636,0	0,149	569,0	0,787	502,0	1,512

Tabla 5.3.1. Continuación

Long. Onda (nm) ¹	Abs ²	Long. Onda (nm)	Abs	Long. Onda (nm)	Abs
635,0	0,152	568,1	0,808	501,0	1,480
634,1	0,154	567,0	0,834	500,1	1,465
633,0	0,159	566,0	0,857	499,0	1,439
632,0	0,162	564,9	0,878	497,9	1,412
631,0	0,165	564,0	0,902	497,0	1,392
630,0	0,169	563,0	0,929	496,0	1,369
628,9	0,173	561,9	0,957	495,1	1,351
628,1	0,176	561,0	0,979	494,0	1,329
627,0	0,179	560,0	1,005	492,9	1,309
626,0	0,184	559,0	1,032	492,0	1,292
625,0	0,188	558,1	1,053	491,0	1,272
623,9	0,191	557,0	1,088	490,0	1,261
623,1	0,195	556,0	1,118	489,0	1,240
622,0	0,200	555,1	1,143	488,1	1,227
621,0	0,204	554,0	1,173	487,0	1,211
620,0	0,209	553,0	1,197	485,9	1,194
618,9	0,215	552,1	1,227	485,0	1,179
618,0	0,219	551,0	1,265	484,0	1,169
617,0	0,224	550,0	1,293	483,1	1,160
616,0	0,228	549,1	1,318	482,0	1,145
615,0	0,234	548,0	1,345	480,9	1,134
614,1	0,239	547,0	1,373	480,0	1,123
613,0	0,245	546,1	1,402	478,9	1,112
612,0	0,251	545,0	1,434	478,0	1,105
611,0	0,256	544,0	1,461	477,0	1,096
609,9	0,262	543,1	1,491	476,1	1,088
609,0	0,268	542,0	1,515	475,0	1,082
608,0	0,275	541,0	1,532	474,1	1,073
607,0	0,283	540,1	1,560	473,0	1,066
605,9	0,289	539,0	1,599	471,9	1,060
605,1	0,297	538,0	1,611	471,0	1,056
604,0	0,304	537,1	1,633	470,0	1,049
603,0	0,312	536,0	1,653	469,0	1,042
602,0	0,319	534,9	1,684	468,0	1,038
601,1	0,327	534,0	1,703	467,1	1,035
600,0	0,336	533,0	1,729	466,0	1,028
599,0	0,346	531,9	1,740	465,1	1,024
598,0	0,355	531,0	1,753	464,0	1,020
597,1	0,362	530,0	1,769	462,9	1,018
596,0	0,371	528,9	1,776	462,0	1,014
595,0	0,383	528,0	1,789	460,9	1,012
594,0	0,393	527,0	1,809	460,0	1,010
593,1	0,403	526,1	1,798	459,0	1,004
592,0	0,414	525,0	1,806	458,0	1,001
591,0	0,425	524,0	1,813	457,0	1,000
589,9	0,437	523,0	1,807	456,1	0,999
589,1	0,448	522,0	1,811	455,0	0,998
588,0	0,460	520,9	1,809	454,1	0,993
587,0	0,474	520,0	1,824	453,0	0,994
585,9	0,489	519,0	1,790	451,9	0,990
585,0	0,500	518,1	1,799	451,0	0,992
584,0	0,512	517,0	1,788	449,9	0,991

¹Long. Onda (nm): longitud de onda en nm; ²Abs: absorbancia.

Tabla 5.3.2. Resumen de parámetros del oro coloidal obtenido

	A540 ¹	A575 ²	A500 ³	A575/500 ⁴	$\lambda_{\text{máx}}$ ⁵ (nm)
Oro Coloidal	1,560	0,664	1,465	0,453	520,0

¹A540: absorbancia a 540 nm; ²A575: absorbancia a 575 nm; ³A500: absorbancia a 500 nm;

⁴A575/A500: relación entre A575 y A500; ⁵ $\lambda_{\text{máx}}$: longitud de onda máxima.

5. RESULTADOS

5.4. Determinación de la Mínima Concentración de Proteína que Protege al Oro (MPC)

Para los Mab obtenidos (tabla 5.2.4.1.) se realizó, para cada uno, la determinación de la mínima concentración de proteína que protege al oro (MPC) (ver 4.2.3.7. de Materiales y Métodos). Las inmunoglobulinas tienen mayor tendencia a estabilizar el oro coloidal a su punto isoeléctrico^{129, 131}. Al ser una especie heterogénea (punto isoeléctrico 6-8)^{129, 147} se realizó a pH 9 y para aquellos Mab que no estabilizaron el oro a este pH, se repitió el ensayo a pH 5 y 7, con una MPC reducida que incluía algunos de los valores más representativos de la curva. Fue el caso de los Mab LPS-1 A, LPS-1 E y LPS-1 F. Estos Mab no estabilizaron tampoco a otros pH, por lo que se conjugaron a pH 9 a la condición estándar de 6 µg/ml para que se encontraran en las mismas condiciones que el resto. Los valores obtenidos para cada MPC se muestran en la tabla 5.4.1.

Tabla 5.4.1. MPC obtenidas para los diferentes Mab estudiados (A: MPC realizadas a pH 9; B: MPC repetidas a pH 5 y 7, sólo puntos clave).

A

A580 nm ¹	LPPA	LPPA	LPPA	LPPA	LPS-1	LPS-1	LPS-1	LPS-1	LPS-1	LPN
[] µg/ml ²	B	C	D	E	A	E	F	H	I F2	F2
0	0,1930	0,2135	0,1993	0,1375	0,1375	0,1591	0,1890	0,2325	0,2064	0,1884
1	0,3138	0,3272	0,3541	0,4956	0,1568	0,3549	0,3923	0,3448	0,4357	0,3404
2	0,4094	0,2234	0,2244	0,4256	0,2187	0,4895	0,4955	0,4276	0,0859	0,1056
3	0,1178	0,0793	0,0614	0,3946	0,2601	0,4739	0,4858	0,2179	0,0470	0,0492
4	0,0688	0,0764	0,0591	0,2136	0,3875	0,4756	0,4813	0,1167	0,0608	0,0425
5	0,0762	0,0710	0,0642	0,1569	0,4296	0,4699	0,4799	0,0964	0,0634	0,0491
6	0,0742	0,0729	0,0648	0,1164	0,4760	0,4692	0,4706	0,0928	0,0455	0,0474
8	0,0819	0,0794	0,0711	0,0929	0,4751	0,4654	0,4554	0,0658	0,0718	0,0584
10	0,0884	0,0783	0,0744	0,0925	0,4785	0,4632	0,4412	0,0615	0,0740	0,0660
12	0,0928	0,0852	0,0777	0,0918	0,4771	0,4701	0,4298	0,0568	0,0795	0,0531
14	0,0940	0,0774	0,0804	0,0879	0,4687	0,4234	0,4286	0,0625	0,0745	0,0866
MPC ³ pH 9	5	5	4	8	6	6	6	6	4	4

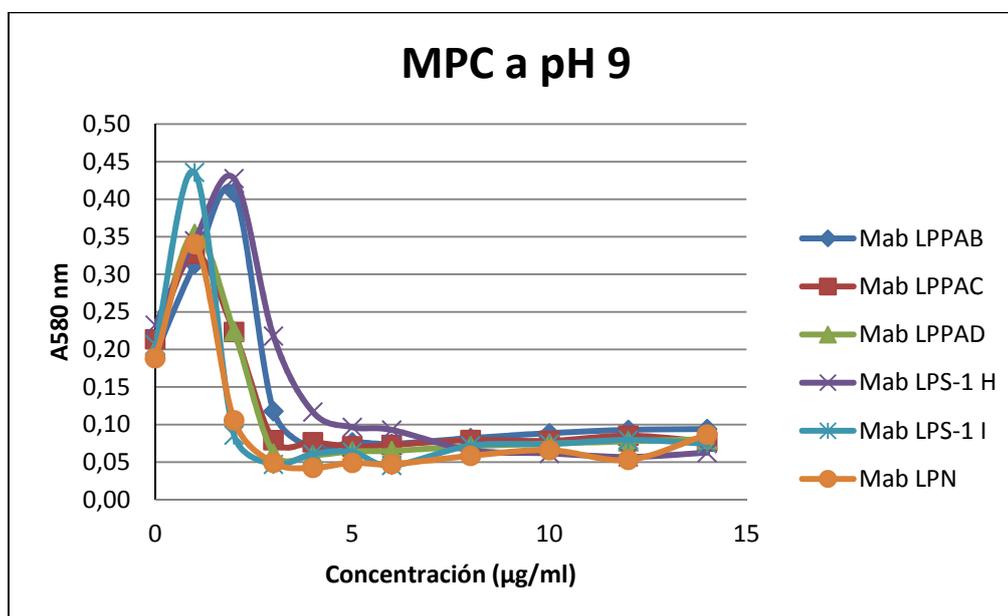
B

A580	LPS-1 E	LPS-1 F	LPS-1 A	A580	LPS-1 E	LPS-1 F	LPS-1 A
[] (µg/ml)				[] (µg/ml)			
0	0,1458	0,1902	NA ⁴	0	0,1183	0,0395	NA
1	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	2	NA	NA	NA
3	0,4791	0,4855	NA	3	0,5019	0,4062	NA
4	NA	NA	NA	4	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	5	NA	NA	NA
6	0,4865	0,4905	NA	6	0,5221	0,4469	NA
8	0,4883	0,4909	NA	8	0,4725	0,4416	NA
10	NA	NA	NA	10	NA	NA	NA
12	NA	NA	NA	12	NA	NA	NA
14	NA	NA	NA	14	NA	NA	NA
MPC pH 7	-	-	-	MPC pH 5	-	-	-

¹A580: absorbancia a 580 nm; ²[] (µg/ml): concentración en microgramos/mililitro; ³MPC: mínima concentración de proteína que protege al oro; ⁴NA: no analizado.

La representación gráfica de dichas MPC se muestra en la figura 5.4.1.

A



B

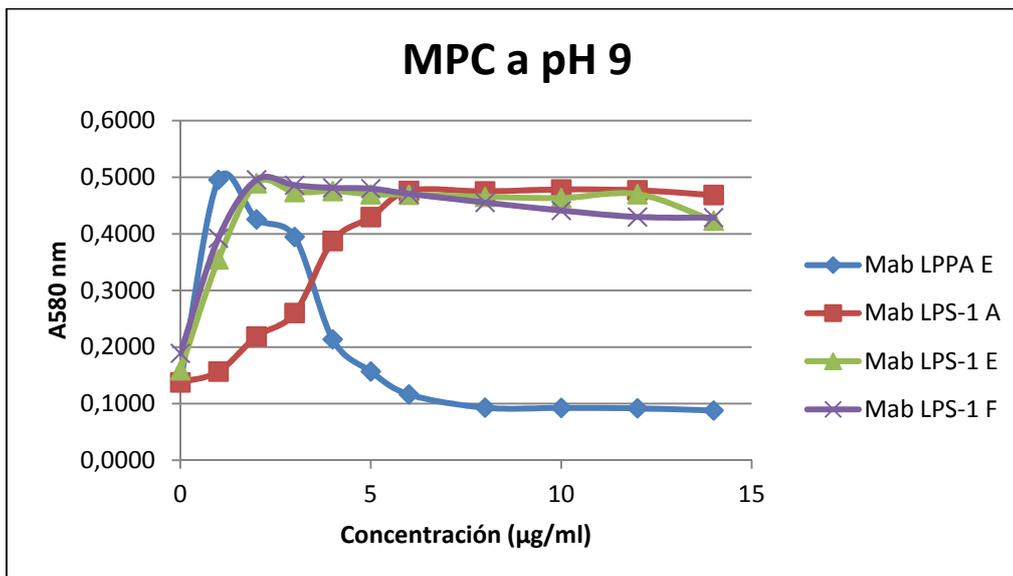


Figura 5.4.1. Representación gráfica de la MPC obtenidas (A: Mab LPPA B, LPPA C, LPPA D, LPS-1 H, LPS-1 I F2 y LPN F2 y B: LPPA E, LPS-1 A, LPS-1 E Y LPS-1 F).

5.5. Conjugación de Anticuerpos Monoclonales al Oro Coloidal

Los parámetros obtenidos para los conjugados preparados para el estudio según su MPC (ver apartado 4.2.3.7. y 4.2.3.8. de Materiales y Métodos) fueron los que se registran en la tabla 5.5.1.:

Tabla 5.5.1. Parámetros obtenidos en la conjugación de los diferentes Mab.

	A540 ¹	A575 ²	A500 ³	A575/500 ⁴	λ _{máx} (nm) ⁵
LPPA B	33,5	16,8	26,2	0,641	527,0
LPPA C	30,9	15,6	24,4	0,639	530,0
LPPA D	29,9	14,8	23,5	0,630	530,0
LPPA E	28,0	7,3	10,7	0,682	530,1
LPS-1 A	NSPC ⁶	NSPC	NSPC	NSPC	NSPC
LPS-1 E	NSPC	NSPC	NSPC	NSPC	NSPC
LPS-1 F	7,8	8,2	5,7	1,429	560,0
LPS-1 H	19,7	10,7	15,3	0,699	528,0
LPS-1 I F2	20,4	11,0	15,7	0,701	529,0
LPN F2	18,9	10,2	14,7	0,694	529,9

¹A540: absorbancia a 540 nm; ²A575: absorbancia a 575 nm; ³A500: absorbancia a 500 nm;

⁴A575/A500: relación entre A575 y A500; ⁵λ_{máx}: longitud de onda máxima; ⁶NSPC: no se pudo conjugar.

5.6. Determinación del Sistema Óptimo

Se comenzó el estudio con las líneas género *Legionella* (GÉN) y *L. pneumophila* sg. 1 (SR1), y se continuó con el Mab comercial para la línea de serogrupos 1 a 15 (ESP). Finalmente las tres líneas se evaluaron conjuntamente hasta el ajuste del sistema final.

5.6.1. Línea Género

Estudio de la funcionalidad de Mab en línea y conjugado

Se analizaron las líneas y conjugados de Mab de LPPA que se habían seleccionado realizando cruces entre ellos. Como condiciones iniciales se dosificaron las líneas a 1 mg/ml y los conjugados a una densidad óptica (OD) de 4. Se usó un protocolo estándar en inmunocromatografía añadiendo 40 µl de *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia o *E. coli* (suspensión de colonias recogida en PBSc e inactivadas por calor; A600~1) más dos gotas de una solución desarrolladora o “developer” (DEV). Se usó pad de poliéster (POL) y se dejó fluir durante 15 minutos.

El resultado obtenido fue el siguiente:

Tabla 5.6.1.1. Resultados de cruce de líneas y conjugados con Mab de LPPA.

<i>E. coli</i>	LPPA B	LPPA C	LPPA D	LPPA E
LPPA B 1 mg/ml	0	<0.5	0	0
LPPA C 1 mg/ml	0	0	0	<0.5
LPPA D 1 mg/ml	<0.5	0	0	0
LPPA E 1 mg/ml	0	0	<0.5	0
<i>Lpn1</i> ²	LPPA B	LPPA C	LPPA D	LPPA E
LPPA B 1 mg/ml	<0.5	0,5	<0.5	2-
LPPA C 1 mg/ml	<0.5	0	<0.5	1
LPPA D 1 mg/ml	0	<0.5	0,5+/1-	0,5+/1-
LPPA E 1 mg/ml	1+	1+	1+	<0.5

¹OD: densidad óptica; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Observando los datos se eligió como línea el Mab LPPA E (denominada GÉN) debido a que era el que mayor reactividad presentaba con la muestra positiva con los demás Mab. Se decidió para el conjugado combinar los otros Mab. Se preparó un mezcla OD 4 con BCDE (OD1+OD1+OD1+OD1), una BCDE' OD 8 (OD2+OD2+OD2+OD2), una BC OD 4 (OD2+OD2) y otra BD OD 4 (OD2+OD2). Se valoraron con la línea de Mab LPPA E y las

5. RESULTADOS

muestras de *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia (A600~1) 1/100 en agua (40µl+2 gotas DEV, POL, 15’).

El resultado obtenido fue:

Tabla 5.6.1.2. Resultados de la evaluación de mezclas de conjugados de LPPA.

<i>Lpn1¹Philadelphia</i>	LPPA E 1 mg/ml
BCDE OD ² 4	<0.5
BCDE' OD8	<0.5
BC OD4	0.5+
BD OD4	1/1+

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1,

²OD: densidad óptica;

Según indicaron estos resultados, la mejor mezcla fue la de BD OD 4. Por otro lado el conjugado de Mab LPPA E con la línea de LPPA E (GÉN) no parecía ir bien en comparación con los otros Mab. El siguiente en reactividad fue la mezcla BC. También había que tener en cuenta que la muestra estaba muy diluida, por lo que se podría elegir una mezcla de BCD y con las OD a partes iguales en principio.

Estudio de la rotura de la membrana de la bacteria

Dada la localización del LPPA en la membrana de la bacteria (ver apartado 1.1.3.), se decidió iniciar el estudio de la rotura de la membrana celular para exponer mejor los epítomos del LPPA a los Mab del conjugado y la membrana.

Métodos de Rotura Física

Se usó la sonicación. Se prepararon muestras de *E. coli* y *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia a McF1 en agua (A600:0.25) y se sonicaron a 50 ciclos y 25% de potencia durante 30 segundos. Se evaluaron con mezclas BD OD 4 y BCD OD 6 (OD2+OD2+OD2) (40µl + 2 gotas DEV, POL, 15’).

El resultado obtenido fue:

Tabla 5.6.1.3. Resultados de la rotura de muestras por sonicación.

	BD OD ¹ 4	BCD OD 6
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	<0.5	<0.5
<i>Lpn1</i> ² Philadelphia	<0.5	0,5+/1-

¹OD: densidad óptica; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

La sonicación no pareció mejorar el resultado para la mezcla BD y si para la BCD, pero la señal no aumentaba considerablemente, por lo que se pensó en una rotura química en vez de física para mejorar la eficiencia y reproducibilidad. Se incluyó ya en la mezcla el Mab LPPA C.

Métodos de Rotura Química

Detergentes

Se realizó un barrido con los detergentes comúnmente usados en tratamientos bioquímicos con carga tanto negativa como positiva, no cargados o anfóteros. Fueron: no iónicos (Tween-20® (T20), Brij®-35, Nonidet P-40 (NP40), emulfojen, Tritón® X-100 (TX100), Tritón® X-114 (TX114)), aniónicos (N-Laurilsarcosina (NL), Ácido Deoxicolato (AD), Dodecilsulfato sódico (SDS)), catiónicos (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB)) y zwitteriónicos (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato (CHAPS)). También se usó β -mercaptoetanol (β m) por su capacidad desnaturizante de proteínas.

Para la valoración de los detergentes se utilizó la mezcla BCD OD 6 (OD₂+OD₂+OD₂) que obtuvo mejores resultados en la rotura física. Se prepararon 100 μ l de *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia y *E. coli* a McF1 y se añadió detergente a una concentración del 1 % en dichas muestras. Se dejó reposar 10 minutos a TA y a continuación se añadieron 40 μ l y 2 gotas de DEV (15', POL). Se comparó en paralelo con las muestras sin detergente (NADA). El resultado obtenido fue:

Tabla 5.6.1.4. Resultados del análisis de diferentes detergentes al 1 % (NADA: extracto sin detergente).

	NADA	T20 ¹	BRIJ
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1</i> ² Philadelphia	0	0	<0.5

Tabla 5.6.1.4. Continuación

	NP40 ³	EMULFOGEN	TX100 ⁴
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	0	<0.5	<0.5
	TX114 ⁵	CHAPS ⁶	NL ⁷
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	<0.5	<0.5	0
	AD ⁸	SDS ⁹	CTAB ¹⁰
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	<0.5
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	<0.5 color	0	0,5-
	β m ¹¹		
	LPPA E 1 mg/ml		
<i>E. coli</i>	<0.5		
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	0,5-		

¹T20: tween-20[®]; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ³NP40: Nonidet P-40; ⁴TX100: Tritón[®] X-100; ⁵TX114: Tritón[®] X-114; ⁶CHAPS: (3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato; ⁷NL: N-laurilsarcosina; ⁸AD: ácido deoxicolato; ⁹SDS: dodecilsulfato sódico; ¹⁰CTAB: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio; ¹¹ β m: β -mercaptoetanol.

En el caso de β m, el oro se agregó por lo que en principio se descartó. Se vio que los mejores resultados se obtuvieron con CTAB y AD (las líneas ya tenían color). Se decidió realizar mezclas de ambos, CTAB-AD (1%-1%) y CTAB-AD (2%-2%). Se realizó el mismo proceso de incubación (10 minutos a TA, 40 μ l + 2 gotas DEV, POL, BCD OD 6,15').

El resultado obtenido fue:

Tabla 5.6.1.5. Resultados del análisis de mezcla de detergentes más favorables.

	CTAB-AD 1-1 ²	CTAB-AD 2-2 ³
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	<0.5
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	0,5	0,5-/0,5

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ²CTAB-AD 1-1: mezcla del detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 1% (p/v) con ácido deoxicolato al 1% (p/v); ³CTAB-AD 2-2: mezcla del detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 2% (p/v) con ácido deoxicolato al 2% (p/v).

La mezcla CTAB-AD 1-1 proporcionó mejor resultado comenzándose a ver una diferencia más patente entre la muestra positiva y la negativa. Se determinó estudiar diferentes incubaciones con dicha mezcla y el análisis con los componentes por separado (al 1 %) con la muestra.

Temperatura

Otro factor importante en la desestabilización de la membrana de la bacteria es la temperatura, por lo que se incluyó en paralelo a los experimentos con detergentes el efecto del calor. Se probó a calentar a 50, 70 y 95 °C, manteniendo el tiempo en 10 minutos. Se añadieron los detergentes a 100 µl de *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia y de *E. coli* a McF1 y se incubaron a las temperaturas indicadas durante 10 minutos dejando enfriar a continuación otros 10 minutos a TA. Se añadieron 40 µl + 2 gotas DEV y se usó POL y BCD OD 6, 15'. Se comparó con muestra sin detergente.

El resultado fue:

Tabla 5.6.1.6. Resultados del análisis con detergentes y calor (NADA: muestra sin detergente).

	NADA	CTAB ²	AD ³	CTAB-AD ⁴
50 °C	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	<0.5	0,5-/0,5	<0.5 color	<0.5 color
70 °C	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	0	<0.5 color	<0.5 color	0.5-
95 °C	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	0	<0.5 color	<0.5	1-/1

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ²CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio; ³AD: ácido deoxicolato;

⁴CTAB-AD: mezcla del detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio con ácido deoxicolato.

Por tanto, tras este experimento se vio que la señal mejoraba con la mezcla de los detergentes y calentando a alta temperatura.

pH

Puesto que el aumento de la temperatura y el uso de detergentes mejoraban el sistema, se consideró modificar también el pH del medio como otro factor importante en la desestabilización de la membrana. Por otro lado, se incluyó el estudio del aumento de cantidad de muestra. Se prepararon las muestras en Tris salino (TS) pH 8 y en fosfato salino (PBS) pH 7.2 y se probaron en las mismas condiciones a 95 °C. En el caso de mayor cantidad de muestra se añadieron 100 µl y se eliminó el DEV. Se comparó con TA a 5 y 15 minutos de incubación.

5. RESULTADOS

El resultado fue:

Tabla 5.6.1.7. Resultados del análisis con mayor cantidad de muestra a TA y 95 ° C.

	TS con CTAB-AD ²	PBS con CTAB-AD ³
95 °C, 40 µl	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	no sale del pad	0
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	0,5-/0,5	0,5
	PBS con CTAB-AD 5'	PBS con CTAB-AD 15'
95 °C, 100 µl	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1	1+
TA⁴, 100 µl	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	<0.5	<0.5 color

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ²TS con CTAB-AD: detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio con ácido deoxicolato en medio Tris salino pH 8; ³PBS con CATB-AD: detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio con ácido deoxicolato en medio fosfato salino pH 7.2; ⁴TA: temperatura ambiente.

Luego al aumentar la cantidad de muestra y la temperatura de incubación, se consiguió una mejora en los resultados. El medio tamponado también ayudó. Al llevar dos detergentes en la mezcla, ésta corrió bien por la membrana, por lo que se valoró la posibilidad de eliminar el DEV en un siguiente paso.

5.6.2. Línea de Serogrupo 1

Estudio de la funcionalidad de Mab en línea y conjugado

Se analizaron las líneas y conjugados de Mab de LPS-1 que se habían seleccionado realizando cruces entre ellos. Como condiciones iniciales se dosificaron las líneas a 1 mg/ml y los conjugados a OD 4. Se usó un protocolo estándar en inmunocromatografía añadiendo 40 µl de *L. pneumophila* sg. 1 y *E. coli* (suspensión de colonias recogida en PBSc e inactivadas por calor; A600~1) a McF1 más 2 gotas de DEV. Se usó pad POL y se dejó desarrollar durante 15 minutos.

El resultado obtenido fue:

Tabla 5.6.2.1. Resultados del cruce de líneas y conjugados de Mab LPS-1. (A: condición estándar inicial, B: titulación Mab)

A

<i>E. coli</i>	LPS-1 F OD ² 4	LPS-1 H OD4
LPS-1 A 1 mg/ml	0,5/0,5+	1-
LPS-1 E 1 mg/ml	1/1+	1-/1
LPS-1 F 1 mg/ml	1/1+	0
LPS-1 H 1 mg/ml	0	0
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	LPS-1 F OD4	LPS-1 H OD4
LPS-1 A 1 mg/ml	1+	2
LPS-1 E 1 mg/ml	2-	3+
LPS-1 F 1 mg/ml	1/1+	2-
LPS-1 H 1 mg/ml	0	0

B

<i>E. coli</i>	LPS-1 H OD4	<i>Lpn1 Philadelphia</i>	LPS-1 H OD4
LPS-1 E 0,75 mg/ml	<0.5	LPS-1 E 0,75 mg/ml	3+
LPS-1 E 0,5 mg/ml	0	LPS-1 E 0,5 mg/ml	1/1+
LPS-1 F 0,25 mg/ml	0	LPS-1 F 0,25 mg/ml	0,5
LPS-1 H 0,125 mg/ml	0	LPS-1 H 0,125	0

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ²OD: densidad óptica.

Al no poder conjugar los Mab de LPS-1 A y E al oro coloidal, se decidió evaluar su funcionalidad en la membrana por las diferentes características superficiales respecto a las partículas de oro coloidal. Para LPS-1 F, el conjugado dio lo mismo con la muestra negativa y positiva, por lo que teniendo en cuenta los demás resultados, se dejó en la línea. En el resto de Mab se vio diferencia entre negativo y positivo, indicando que podían funcionar, pero que sus proporciones necesitaban ser ajustadas. Se estudiaron diferentes concentraciones para LPS-1 E, ya que había dado muy alta señal con el positivo y el negativo, viéndose que a una concentración menor el sistema funcionaría sin fondos en esa línea. Observando todos estos datos se eligieron para la línea como mejor opción LPS-1 A, E y F, mientras que LPS-1 H se reservó para el conjugado.

Se dosificaron entonces mezclas para la línea de Mab de LPS-1 A, E y F y el conjugado de LPS-1 H se dosificó a OD 1, 2 y 4, seleccionándose finalmente OD 1.

5. RESULTADOS

Estudio de la rotura de la membrana de la bacteria

Métodos de Rotura Química

Detergentes y Temperatura

Ya se habían probado en este punto los detergentes y el calor en el caso de la línea género, por lo que se utilizaron las condiciones determinadas con este sistema. Se evaluaron las líneas de LPS-1 A, E y F con 40 µl de muestra positiva y negativa tratada con CTAB-AD 1%-1% incubando 10 minutos a 95 °C + 10 minutos a TA y sólo 10 minutos a TA, así como sin detergentes (2 gotas DEV, POL, 15').

El resultado obtenido fue:

Tabla 5.6.2.2. Resultados del análisis de líneas de LPS-1 con mezclas de detergentes a TA y 95 °C (NADA: muestra no tratada).

NADA 95 °C	LPS-1 A 1 mg/ml	LPS-1 E 0,5 mg/ml	LPS-1 F 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	3/3+	1/1+	1+/2-
CTAB-AD ² 95 °C	LPS-1 A 1 mg/ml	LPS-1 E 0,5 mg/ml	LPS-1 F 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	1	1-	1-/1
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1	1/1+	1-/1
CTAB-AD TA ³	LPS-1 A 1 mg/ml	LPS-1 E 0,5 mg/ml	LPS-1 F 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0,5	1/1+	0,5+/1-
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1-/1	1/1+	1-/1

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ²CTAB-AD: detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio con ácido deoxicolato; ³TA: temperatura ambiente.

Por tanto, el tratamiento con detergentes aplicado a GÉN era bastante inespecífico con el sistema para SR1 pero la incubación con calor le beneficiaba. Se probaron los detergentes por separado y se observó que el problema estaba en la mezcla de ellos, no afectando el aumento de temperatura a la señal específica, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5.6.2.3. Resultados del análisis de líneas de LPS-1 con detergentes separados.

	CTAB ¹ 1%	AD ² 1%
10' TA ³ + 10' 95 °C	LPS-1 F 1 mg/ml	LPS-1 F 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1⁴ Philadelphia</i>	0,5-/0,5	0,5-

¹CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio; ²AD: ácido deoxicolato; ³TA: temperatura ambiente; ⁴Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Fuerza iónica

Para el estudio de la fuerza iónica, se comenzó añadiendo NaCl al medio para aumentar la cantidad de iones presentes y ver si tenía el mismo efecto que el detergente aniónico. Se probó CTAB con NaCl 1.2, 0.6, 0.3, 0.15 y 0.075 M con SR1 (una sola línea compuesta de la mezcla de LPS-1 A, E y F). Se incubaron las muestras con los medios 10 minutos a TA + 10 minutos a 95 °C y se añadieron 40 µl + 2 gotas DEV (POL, 15').

Tabla 5.6.2.4. Resultados del análisis de CTAB con NaCl a diferentes concentraciones

	CTAB ¹ -NaCl 1,2 M	CTAB-NaCl 0,6 M	
	LPS-1 AEF	LPS-1 AEF	
<i>E. coli</i>	0	0	
<i>Lpn1</i> ² <i>Philadelphia</i>	0	<0.5	
	CTAB-NaCl 0,3 M	CTAB-NaCl 0,15 M	CTAB-NaCl 0,075 M
	LPS-1 AEF	LPS-1 AEF	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	NA ³	NA	NA
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	<0.5	0.5-	<0.5 color

¹CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ³NA: no analizado.

Se vio que a menor concentración de NaCl mayor señal se producía en SR1, por lo que una gran cantidad de NaCl en estas condiciones no incrementaba la respuesta, pero si se observó que con 150 mM (salino) el sistema se quedaba igual y no afectaba demasiado para la señal positiva, por lo que se tendría en cuenta para experimentos posteriores.

5.6.3. Líneas Género y Serogrupo 1

Se comenzaron a ver los mismos experimentos en paralelo para las dos líneas, porque se pensó en la posibilidad de llevarlas juntas en un solo casete, pero de momento se iba a ver por separado cada condición. Las muestras inactivadas por calor de cultivos de *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia y de *E. coli* se usaron a McF1 (A600:0.25).

5. RESULTADOS

Estudio de la rotura de la membrana de la bacteria

Métodos de Rotura Química

Detergentes

Como la mezcla CTAB-AD produjo resultados muy inespecíficos para SR1, se prepararon mezclas de detergentes diferentes manteniendo como base el CTAB, porque en GÉN había ido bien. Para ello se mezcló CTAB (al 1 %) con AD, NL, NP40, Brij, SDS y T20. Se valoró la línea de LPPA E con BCD OD 6 y las de LPS-1 con H OD 1. Se usó 40 µl (muestras 10 minutos a TA +10 minutos a 95 °C) + 2 gotas de DEV (POL, 15’).

El resultado fue:

Tabla 5.6.3.1. Resultados del análisis de mezclas de CTAB con otros detergentes (A: CTAB y CTAB-NP40 con LPPA-E y LPS-1 A y E, B: análisis de CTAB con otros detergentes para LPPA-E y la línea de LPS-1 A).

A

CTAB ¹	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 A 1 mg/ml	LPS-1 E 0,5 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1</i> ² <i>Philadelphia</i>	0,5	<0.5	0,5/0,5+
CTAB-NP40 ³	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 A 1 mg/ml	LPS-1 E 0,5 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	<0.5	<0.5
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1+	1	0,5+

B

	CTAB-T20 ⁴	CTAB-T20	CTAB-Brij	CTAB-SDS ⁵
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 A 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0,5+/1-	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1+	1+	0,5-	0,5/0,5+

¹CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ³NP40: Nonidet NP-40; ⁴T20: Tween[®]-20; ⁵SDS: dodecilsulfato sódico.

La mezcla CTAB-NP40 funcionó bien para la línea GÉN, pero se obtuvieron fondos para SR1. En el caso de los otros detergentes, la mayor señal se obtuvo con CTAB-T20 para GÉN, pero era inespecífico para SR1, indicando estos resultados que los detergentes no iónicos eran los que mejor respuesta proporcionaban con estas condiciones.

Se dosificaron los Mab A, E y F de LPS-1 conjuntamente en una misma línea (línea SR1) para trabajar ya con un sistema único en membrana.

Antibiótico

Se comenzó a trabajar con Sulfato de Polimixina-B (PMB), un antibiótico fuertemente catiónico. Esta sustancia produce la desestabilización de las membranas citoplasmáticas induciendo la formación de poros en las paredes celulares en bacterias Gram-negativas al unirse al lípido-A del LPS¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Se preparó a 10 mg/ml en agua. Según el fabricante (Sigma-Aldrich) esto correspondería a unas 65000 IU (unidades internacionales)/ml. Esta solución se evaluó añadiendo diferentes volúmenes de PMB 10 mg/ml a 100 µl de muestra de cultivo McF1, incubando 5 minutos a TA, ó 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C (40 µl + 2 gotas DEV, POL, 15', BCD OD 6, H OD 1):

Tabla 5.6.3.2. Resultados de la valoración de diferentes cantidades de PMB a diferentes temperaturas.

10 µl PMB ¹		
5' TA ²	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	<0.5	3-/3
<i>Lpn1</i> ³ <i>Philadelphia</i>	<0.5 color	3/3+
5' TA + 5' 95 °C	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	<0.5	3/3+
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	0,5	3+
1 µl PMB		
5' TA	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	0,5-	2

¹PMB: sulfato de polimixina-B; ²TA: temperatura ambiente;

³Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Se pudo ver que con 10 µl para GÉN y SR1 las condiciones producían resultados inespecíficos en la muestra negativa, pero mucho más para SR1. Al disminuir la cantidad y la temperatura el sistema mejoró, aunque para GÉN se obtuvo menor señal que con CTAB, por lo que se decidió ver en conjunto ambas condiciones.

Detergentes, Antibiótico y Fuerza Iónica

Ya se había valorado CTAB+NaCl (ver tabla 5.6.2.4), por lo que se añadió NaCl a la mezcla CTAB+PMB para darle fuerza iónica al medio con el fin de ver la función de este sobre los fondos obtenidos. Se incubaron las muestras con CTAB 1%-NaCl 150 mM y 1 y 10 µl de

5. RESULTADOS

PMB durante 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C, añadiendo 40 µl + 2 gotas DEV (POL, 15', BCD OD 6, H OD 1):

Tabla 5.6.3.3. Resultados de las muestras con medio con NaCl con PMB a diferentes temperaturas.

1 µl PMB ²	5' TA ¹ + 5' 95 °C		10' TA	
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	sombra	0	0	0
<i>Lpn1</i> ³ <i>Philadelphia</i>	0,5+/1-	0,5-/0,5	<0.5 color	<0.5
10 µl PMB	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	sombra	0	sombra	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	0,5+/1-	<0.5 color	<0.5 color	0,5-

¹TA: temperatura ambiente; ²PMB: sulfato de polimixina-B; ³Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

De este experimento se dedujo que con 10 µl de PMB la línea SR1 no tenía fondos en la muestra negativa al llevar el CTAB, y que el calor parecía necesario ya que la señal era mayor en GÉN.

Siguiendo estas directrices, se decidió ver el detergente no iónico T20 que era el que llevaba el DEV y no parecía añadir inespecificidad, por lo que tal vez en la mezcla final sería más efectivo y se podría eliminar dicho DEV. Se probó al 1 % como se había hecho con el resto de detergentes. Por tanto, el medio ahora era NaCl-T20-PMB (no se puso CTAB para ver el efecto del T20 sólo) (10 minutos a TA + 10 minutos a 95 °C, 40 µl + 2 gotas DEV, POL; 15', BCD OD 6 y H OD 1):

Tabla 5.6.3.4. Resultados del análisis de medio sin CTAB pero con T20.

10 µl PMB ¹	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	sombra	sombra
<i>Lpn1</i> ² <i>Philadelphia</i>	1+	1-/1

¹PMB: sulfato de polimixina-B; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Por lo tanto, la mezcla con T20 y sin CTAB mejoraba la señal en SR1. Se decidió entonces ver el ajuste de la cantidad de PMB a usar, añadiendo 1, 2.5, 5 y 10 µl por cada 100 µl de muestra, con las condiciones del experimento anterior.

Tabla 5.6.3.5. Resultados del análisis del medio T20-NaCl con diferentes cantidades de PMB (A: diferentes cantidades de PMB, B: muestra más concentrada (McF2) con 5 µl de PMB)

A

	1 µl PMB ¹		2,5 µl PMB	
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	0	sombra	0	0
<i>Lpn1</i> ² <i>Philadelphia</i>	0,5	0,5	1-/1	0,5+/1-

Tabla 5.6.3.5. Continuación

A (continuación)

	5 µl PMB		10 µl PMB	
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	0	sombra	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1-/1	1-	1	1-

B

McF2 ³	5 µl PMB	
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1/1+	1

¹PMB: sulfato de polimixina-B; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ³McF2: McFarland 2.

Se pudo ver que a mayor cantidad de PMB más específico se hacía el sistema, así como aumentaba la señal positiva, por lo que cantidades de 5 y 10 µl de PMB parecían apropiadas para la mezcla. Por otro lado, el sistema no se hacía más inespecífico si se probaba con mayor cantidad de muestra, por lo que a priori se había desarrollado un medio eficiente en la rotura química de la membrana de la bacteria.

Se decidió ver entonces el sistema con 90 µl (equivalente a 40 µl + 2 gotas DEV) de muestra para evitar el uso de un DEV, ya que contenía el mismo detergente que se encontraba en el sistema en este momento. El medio probado fue NaCl-T20-PMB (5 µl de PMB) con 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C.

Tabla 5.6.3.6. Resultados del análisis de 90 µl de muestra sin DEV con NaCl-T20-PMB.

	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1</i> ¹ <i>Philadelphia</i>	1-	1

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Daba bien por lo que se podría eliminar el DEV.

5. RESULTADOS

Se cruzaron las líneas y conjugados con estas condiciones para ver si podían ir juntos los strips, pero se vio que aparecían fondos, por lo que de momento GÉN y SR1 irían en tiras separadas. Quedó patente que sin CTAB SR1 mejoraba. Se decidió ver diferentes cantidades de PMB en este medio NTP con 90 µl de muestra, probando 5, 10 y 20 µl.

Tabla 5.6.3.7. Resultados del análisis de NTP con diferentes cantidades de PMB.

NTP ¹ PMB ² 5		
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1</i> ³ Philadelphia	1+	1+
NTP PMB 10		
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	sombra	0
<i>Lpn1</i> Philadelphia	0.5+/1-	1+
NTP PMB 20		
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	sombra	0
<i>Lpn1</i> Philadelphia	0.5	1/1+

¹NTP: mezcla de NaCl, Tween[®]-20 y sulfato de Polimixina-B; ²PMB: sulfato de polimixina-B; ³Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

A GÉN no parecía beneficiarle una alta cantidad de PMB y en SR1 no se veía mejoría tampoco a mayor proporción, por lo que 5 µl se consideró una cantidad apropiada.

Estudio del tiempo de reacción

Se probó a incubar durante más tiempo para ver si manteniendo el medio y las condiciones se mejoraba la señal. Se usó NTP y se incubó 5 minutos a TA y 5 minutos a 95 °C, dejando luego desarrollar el test 15 y 30 minutos (POL, BCD OD 6, H OD 1).

Tabla 5.6.3.8. Resultados de la valoración de diferentes tiempos de reacción.

15 min		
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	sombra	sombra
<i>Lpn1</i> ¹ Philadelphia	1+	1+
30 min		
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1</i> Philadelphia	1+/2-	2-

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Se observó un incremento significativo en la misma, sin aumento de la respuesta de los negativos, por lo que mayor tiempo de test podía mejorar la señal si era necesario.

Estudio de procedencia de la muestra

Se probaron entonces colonias directamente desde una placa en vez de extractos de cultivos inactivados por calor para ver si la señal variaba respecto al método de estudio. Se probaron 1, 2 y 3 colonias en 200 µl de NTP a 15 y 30 minutos de test. Las colonias se recogieron de la placa y se depositaron en el NTP, se vortearon y se incubaron los viales 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C (POL, BCD OD 6, H OD 1):

Tabla 5.6.3.9. Resultados del análisis de diferentes cantidades de colonias vivas directas desde placas de cultivo a diferentes tiempos.

	15 min		30 min	
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
1 col ¹ /200 µl				
<i>E. coli</i>	0	sombra	sombra	sombra
<i>Lpn1²Philadelphia</i>	1+	1+	1+	1+
2 col/200 µl				
<i>E. coli</i>	sombra	sombra	sombra	<0.5
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1+/2-	1+/2-	1+/2-	1+/2-
3 col/200 µl				
<i>E. coli</i>	sombra	Sombra	sombra	sombra
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1+	1+/2-	1+	2-

¹col: colonias; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Por tanto, desde colonias vivas de una placa se obtuvieron los mismos resultados que con los extractos en PBSc hervidos y almacenados a 4 °C. Por otro lado, a mayor número de colonias se obtenía algo más de señal. Esto permitiría conservar las muestras como extractos y no como placas vivas cuando el número de ellas fuese elevado.

Evaluación inicial de muestras. Bloqueo de pads

Parecía que con el medio determinado en este momento, NTP, y la incubación a TA y 95 °C, se tendría un sistema inicial apropiado que permitiese evaluar más muestras. Se decidió probar algunos cultivos de colección del grupo I para ver en qué punto se encontraba el test. Se testaron muestras de *L. pneumophila* del sg. 1 al 15 recogidos a razón de 1 col/100 µl. Se usó NTP con 5 minutos a TA y 5 minutos a 95 °C de incubación (POL, 15', BCD OD 6, H OD 1):

Tabla 5.6.3.10. Resultados del análisis de diferentes cepas de *Legionella pneumophila*.

	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>Lpn</i> ¹ <i>1</i>	1+/2-	1+
<i>Lpn</i> 2	1+/2-	0,5+
<i>Lpn</i> 3	1+	0,5-/0,5
<i>Lpn</i> 4	1+/2-	0,5-
<i>Lpn</i> 5	1+/2-	<0.5
<i>Lpn</i> 6	1+	<0.5
<i>Lpn</i> 7	2--	<0.5
<i>Lpn</i> 8	1+/2-	<0.5
<i>Lpn</i> 9	2-	<0.5
<i>Lpn</i> 10	2-	0,5+/1-
<i>Lpn</i> 11	2-	0,5-
<i>Lpn</i> 12	2-	<0.5
<i>Lpn</i> 13	2-	<0.5 color
<i>Lpn</i> 14	1+/2-	<0.5 color
<i>Lpn</i> 15	1+	<0.5

¹Lpn: *L. pneumophila*.

Aparecieron numerosos fondos en la línea de SR1, por lo que se planteó la posibilidad de bloquear el pad de muestra. Se probó un pad con un bloqueo estándar en inmunocromatografía: NaCl para darle fuerza iónica y caseína como proteína bloqueante. Se analizaron las cepas de nuevo con un pad de POL bloqueado con NaCl 250 mM - Caseína 0.3 % (POLCAS):

Tabla 5.6.3.11. Resultados del análisis de diferentes cepas de *Legionella pneumophila* con pad bloqueado.

	LPS-1 AEF		LPS-1 AEF
<i>Lpn</i> ¹ <i>1</i>	1+	<i>Lpn</i> 8	0
<i>Lpn</i> 2	0	<i>Lpn</i> 9	0
<i>Lpn</i> 3	0	<i>Lpn</i> 10	0
<i>Lpn</i> 4	0	<i>Lpn</i> 11	0
<i>Lpn</i> 5	0	<i>Lpn</i> 12	0
<i>Lpn</i> 6	0	<i>Lpn</i> 13	0
<i>Lpn</i> 7	0	<i>Lpn</i> 14	0
		<i>Lpn</i> 15	0

¹Lpn: *L. pneumophila*.

Se mantuvo la señal específica y desapareció la inespecífica, por lo que el strip de SR1 debería llevar un pad bloqueado.

Para ver entonces la especificidad con otros cultivos de bacterias no *Legionella*, se probaron 13 diferentes que se recogieron en la proporción 1 col/100 µl. Para GÉN se usó POL y para SR1 POLCAS, 15’:

Tabla 5.6.3.12. Resultados del análisis de diferentes cepas no *Legionella*.

	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sombra	0
<i>Salmonella</i>	sombra	0
<i>Proteus mirabilis</i>	sombra	0
<i>Xantomonas</i>	sombra	0
<i>Aeromonas</i>	sombra	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	sombra	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	sombra	0
<i>Escherichia coli</i>	sombra	0
<i>Serratia</i>	sombra	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	sombra	0
<i>Bacillus cereus</i>	sombra	0
<i>Klebsiella</i>	sombra	0
<i>Citrobacter</i>	sombra	0

Luego en la línea de GÉN también había fondos, aunque menores que para SR1 sin bloqueo, por lo que se probaron con el pad POLCAS.

Tabla 5.6.3.13. Resultados del análisis de diferentes cepas de no *Legionella* con pad bloqueado.

	LPPA E 1 mg/ml
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0
<i>Xantomonas</i>	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0
<i>Bacillus cereus</i>	0

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Pareció evidente que la tira de GÉN también necesitaba un pad bloqueado, por lo que se le añadió a ambos strips.

5. RESULTADOS

Se siguieron evaluando cultivos de diferentes legionellas (NTP 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C, 15', POLCAS):

Tabla 5.6.3.14. Resultados del análisis de diferentes cepas de *Legionella*.

	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>L. longbeachae</i> sg. ¹ 1	2-	0
<i>L. longbeachae</i> sg. 2	2-	0
<i>L. bozemanii</i> sg. 1	sombra	0
<i>L. bozemanii</i> sg. 2	<0.5-	0
<i>L. dumoffi</i>	2-/2	0
<i>L. micdadei</i>	1+	0
<i>L. gormanii</i>	0	0
<i>Lpn1</i> ² Benidorm	1+	1+/2-
<i>Lpn1</i> Camperdown	1+	0
<i>Lpn1</i> Heysham	1+	0
<i>Lpn1</i> Kingston	1+	1
<i>Lpn1</i> Bellingham	1+	0
<i>Lpn1</i> Murcia	1+	1
<i>Lpn1</i> Knoxville	1+	2-
<i>Lpn1</i> Allentown	1+	1
<i>Lpn1</i> France	1/1+	2-
<i>Lpn1</i> OLDA	1/1+	0
<i>Lpn1</i> Oxford	1/1+	0
<i>Lpn1</i> Pontiac	1	1+
<i>Lpn1</i> Cambridge	1+	1-/1

¹sg.: serogrupo; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

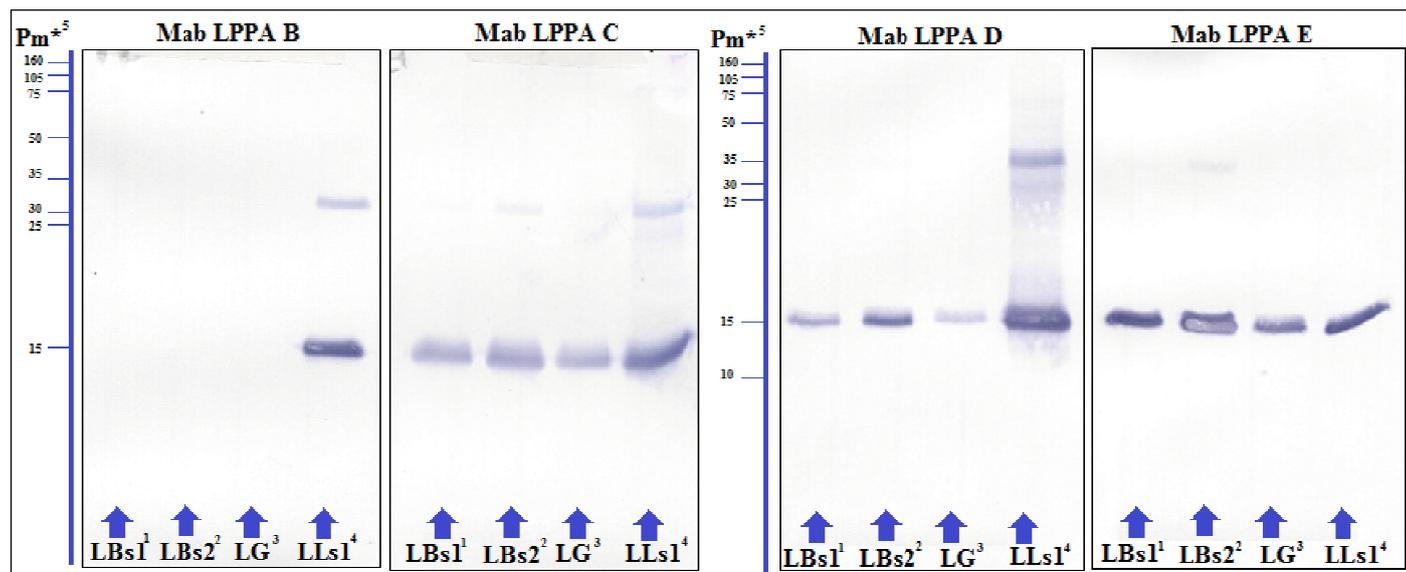
Los resultados eran correctos excepto para *L. bozemanii* sg. 1 y 2 y para *L. gormanii*, que daban valores negativos para la línea de GÉN, y para *L. pneumophila* sg. 1 Camperdown, *L. pneumophila* sg. 1 Heysham, *L. pneumophila* sg. 1 Bellingham, *L. pneumophila* sg. 1 OLDA y *L. pneumophila* sg. 1 Oxford para SR1, ya que daban negativas y eran muestras positivas para esta línea. Se probó con pad no bloqueado (POL) y el resultado para estas legionellas fue el mismo, negativo. De nuevo con pad bloqueado (POLCAS), se analizó el doble de colonias, y mismo número de colonias pero sonicando, ya que aunque este método físico no ayudó mucho anteriormente, con las nuevas condiciones quizá aportaba algo, pero seguían siendo negativas.

Antes de continuar evaluando más muestras, se intentó ver qué ocurría y cómo se podía solucionar.

5.6.4. Solución de Problemas de la Línea Género

Estudio de funcionalidad de los Mab con los cultivos preparados

Se preparó un Western-blot cargando las cepas problemáticas *L. bozemanii* sg. 1 y sg. 2, *L. gormanii* y *L. longbeachae* sg. 1 como control en la membrana, cuyo resultado se muestra en la siguiente figura (ver métodos 4.2.3.3.):



¹LBs1: carril con *L. bozemanii* sg. 1, ²LBs2: carril con *L. bozemanii* sg. 2, ³LG: carril con *L. gormanii*, ⁴LLs1: carril con *L. longbeachae* sg. 1, ⁵Pm*: marcadores de pesos moleculares del Western-blot.

Figura 5.6.4.1. Western-blot realizado con cepas de *Legionella* problemáticas

(Los Mab de LPPA se pusieron como muestras (LPPA B, LPPA C, LPPA D Y LPPA E), y el revelado se realizó con un conjugado anti-ratón peroxidado).

Se observó que todos los Mab daban señal con las cepas en mayor o menor grado, luego el problema parecía ser del sistema en inmunocromatografía, o sea, no se estaba rompiendo eficientemente la bacteria porque en estos casos no se detectaba el LPPA.

Con el fin de comprobar si había actividad con los cultivos preparados con los Mab que se estaban usando, se sensibilizaron placas de ELISA (ver métodos 4.2.3.2.) con *L. bozemanii* sg. 1 y 2 y *L. gormanii*, y como controles positivos se usaron *L. longbeachae* sg. 1 y *L. micdadei* y como control negativo *E. coli*. Se probaron los Mab como muestras. Se incluyó el Mab de LPPA F por si se obtenía algún resultado que indicase si era necesario su uso. Se obtuvo como resultado el que se muestra en la tabla siguiente:

5. RESULTADOS

Tabla 5.6.4.1. Resultado del ensayo de ELISA realizado con placas sensibilizadas con cepas de *Legionella* con Mab de LPPA B, C, D, E y F como muestra.

	Mab LPPA B	Mab LPPA C	Mab LPPA D	Mab LPPA E	Mab LPPA F
<i>L. bozemanii</i> sg. ¹ 1	+	-	+	+	-
<i>L. bozemanii</i> sg. 2	+	+	+	+	-
<i>L. gormanii</i>	+	+	+	+	-
<i>L. longbeachae</i> sg.1	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-

sg.: serogrupo; -: negativo; +: positivo.

Se prepararon también unos porta-objetos de inmunofluorescencia (ver métodos 4.2.3.4.) sensibilizados con *L. longbeachae* sg. 1 como control positivo y *E. coli* como control negativo, y *L. bozemanii* serogrupos 1 y 2 y *L. gormanii*. El resultado puede verse en la siguiente tabla:

Tabla 5.6.4.2. Resultado del ensayo de inmunofluorescencia realizado con portaobjetos sensibilizados con cepas de *Legionella* con Mab de LPPA B, C, D y E como muestra.

	Mab LPPA B	Mab LPPA C	Mab LPPA D	Mab LPPA E
<i>L. bozemanii</i> sg. ¹ 1	-	+	-	-
<i>L. bozemanii</i> sg. 2	-	+	-	-
<i>L. gormanii</i>	-	+	-	-
<i>L. longbeachae</i> sg. 1	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-

sg.: serogrupo; -: negativo; +: positivo.

En el ensayo de ELISA se obtuvo como resultado que todos los Mab de LPPA (B, C, D y E) salvo LPPA F, proporcionaban señal positiva con *L. longbeachae* sg. 1. Los Mab daban resultado positivo con *L. bozemanii* sg. 1 y 2 y *L. gormanii* en general, mientras que en inmunofluorescencia con *L. bozemanii* serogrupos 1 y 2 y *L. gormanii* sólo tenía señal positiva el Mab LPPA C. El ELISA es una técnica mucho más sensible, lo que justificaría la diferencia de resultados. Pero aún así la conclusión era la misma, por otras técnicas los Mab sí reconocían estas muestras.

Estudio de la rotura de la membrana de la bacteria**Métodos de Rotura Física**

Se realizó un estudio de rotura con bolas de vidrio. Se evaluaron diferentes volúmenes de bolas con 200 µl de *L. pneumophila* sg. 1 a una concentración de McF1. Se agitó un minuto en vortex, se dejó decantar y el sobrenadante se añadió al test. Se comparó con el método normal sin y con tratamiento (90 µl, POLCAS, BCD OD6, NTP, 5' TA + 5' 95 °C):

Tabla 5.6.4.3. Resultados del tratamiento con bolas de vidrio y NTP.

	<i>Lpn1</i> ¹ McF1 no tratada	<i>Lpn1</i> McF1 tratada
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
No bolas	<0,5 color	1+/2-
10 µl de bolas	sombra	1+
25 µl de bolas	sombra	1+
50 µl de bolas	<0,5 color	1+
100 µl de bolas	<0,5 color	1+/2-

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1 Philadelphia.

A mayor número de bolas parecía que sin tratamiento mejoraba algo, pero nada significativo en comparación con la tratada. Con la mayor cantidad de bolas en 200 µl de muestra a McF1, combinada con calor y NTP, se probaron las legionellas problemáticas:

Tabla 5.6.4.4. Resultados del tratamiento con mayor cantidad de bolas de vidrio.

	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0
<i>L. bozemanii</i> sg. ² 1	<0.5 color
<i>L. bozemanii</i> sg. 2	<0.5 color
<i>L. gormanii</i>	sombra

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1 Philadelphia; ²sg.: serogrupo

Pero el resultado no fue bueno, por lo que se pasó entonces a una agitación más agresiva en el vortex con las bolas con tratamiento con calor y NTP (NTP + 5 minutos de vortex + 5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C + 5 minutos de vortex). El resultado es el que se muestra en la siguiente tabla:

5. RESULTADOS

Tabla 5.6.4.5. Resultados de la comparación con y sin bolas de vidrio con mayor agitación.

	NO BOLAS	BOLAS
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	<0,5 color	<0,5 color
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	2-	2-

¹sg.: serogrupo

El resultado fue el mismo con ambos métodos, por lo que la conclusión era que había roto el método químico y que el físico no había aportado más señal en principio. Como última opción se decidió probar diferentes protocolos. Se analizaron las siguientes condiciones manteniéndolo como medio NTP:

- 1) normal: 5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C
- 2) 1 minuto de vortex + 5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C
- 3) 1 minuto de vortex + 5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C + 1 minuto de vortex
- 4) 5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C + 1 minuto de vortex.

Tabla 5.6.4.6. Resultados del tratamiento con bolas de vidrio y NTP con diferentes protocolos.

	1	2	3	4
	LPPA E 1 mg/ml			
<i>E. coli</i>	0	0	sombra	<0,5 color
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	2-	2-	1+	1+
<i>L. bozemanii</i> sg. ² 1	sombra	NA	sombra	NA
<i>L. bozemanii</i> sg. 2	<0,5 color	NA	<0,5 color	NA
<i>L. gormanii</i>	<0,5 color	NA	<0,5 color	NA

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ²sg.: serogrupo;

1: 5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C; 2: 1 minuto de vortex + 5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C; 3: 1 minuto de vortex + 5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C + 1 minuto de vortex; 4: 5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C + 1 minuto de vortex.

El resultado no fue satisfactorio y mayor tiempo de agitación en vortex disminuía la señal, por lo que se desestimó nuevamente los métodos de rotura física como solución.

Métodos de Rotura Química*Detergentes*

Para resolverlo, se volvió a ver el detergente CTAB que se eliminó por ofrecer peores resultados que los no iónicos. Se probó NTP con CTAB al 0.3, 0.6, 2 y 4 % (5' TA + 5' 95 °C, POLCAS, 15', BCD OD 6):

Tabla 5.6.4.7. Resultados del análisis con diferentes tanto por ciento de CTAB.

	CTAB¹ 4	CTAB 2
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1² Philadelphia</i>	1-	1-/1
	CTAB 1	CTAB 0,6
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1-/1	2
	CTAB 0,3	CTAB 0,1
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	sombra	sombra
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	2	2-
	CTAB 0,05	CTAB 0,025
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	sombra	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	1+/2-	1+/2-

¹CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Menor cantidad de CTAB producía mayor señal en la línea GÉN, pero mayor porcentaje de CTAB perjudicaba a la línea SR1 (ver tabla 5.6.3.1.), por lo que finalmente se desestimó su uso. Se pasó al estudio de otros factores como el pH.

pH

Se decidió entonces darle un pH al medio NTP, ya que hasta ahora no se había tenido en cuenta y era el resultante de la mezcla de todos los reactivos (~pH 4-5). Se probó fosfato 50 mM a pH 7.2 y Borax 50 mM a pH 9 (5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C, POLCAS, 15'):

Tabla 5.6.4.8. Resultados del análisis con NTP tamponado con fosfatos o Borax.

	NTP ¹	BNTP ²	FNTP ³
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	sombra	sombra	sombra
<i>Lpn1</i> ⁴ Philadelphia	2-/2	1	2-

¹NTP: mezcla de NaCl, Tween[®]-20 y sulfato de Polimixina-B; ²BNTP: mezcla de NaCl, Tween[®]-20 y sulfato de Polimixina-B tamponada con Borax pH 9; ³FNTP: mezcla de NaCl, Tween[®]-20 y sulfato de Polimixina-B tamponada con fosfato pH 7.2; ⁴Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Luego a pH 9 *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia empeoraba pero pH 7.2 daba igual, por lo que se dejó pH 7.2 para que tamponase el medio y porque se mantenía la señal. Había que probarlo entonces con las legionellas problema:

Tabla 5.6.4.9. Resultados del análisis de FNTP con las legionellas problemáticas.

FNTP ¹	LPPA E 1 mg/ml
<i>L. bozemanii</i> sg. ² 1	0,5
<i>L. bozemanii</i> sg. 2	0,5-/0,5
<i>L. gormanii</i>	0,5+/1-

¹FNTP: mezcla de NaCl, Tween[®]-20 y sulfato de Polimixina-B tamponada con fosfato pH 7.2; ²sg.: serogrupo.

Al utilizar un medio tamponado pasaban a ser positivas, por lo que se escogió pH 7.2.

5.6.5. Solución de Problemas de la Línea Serogrupo 1

Estudio de funcionalidad de los Mab con los cultivos preparados

Se sensibilizaron unos porta-objetos de inmunofluorescencia con *E. coli* y *L. pneumophila* sg. 1 Knoxville como controles negativo y positivo respectivamente, y *L. pneumophila* sg. 1 Camperdown, *L. pneumophila* sg. 1 Bellingham, *L. pneumophila* sg. 1 Heysham, *L. pneumophila* sg. 1 OLDA y *L. pneumophila* sg. 1 Oxford.

Tabla 5.6.5.1. Resultado obtenido en el análisis por inmunofluorescencia de porta-objetos sensibilizados con cepas de *Legionella* y Mab de LPS-1 como muestra.

	LPS-1 A	LPS-1 E	LPS-1 F	LPS-1 H
<i>E. coli</i>	-	-	-	-
<i>Lpn1</i> ¹ Knoxville	-	-	+	+
<i>Lpn1</i> Camperdown	-	+	+	-
<i>Lpn1</i> Bellingham	-	-	-	-

Tabla 5.6.5.1. Continuación

	LPS-1 A	LPS-1 E	LPS-1 F	LPS-1 H
<i>Lpn1</i> Heysham	-	-	-	-
<i>Lpn1</i> OLDA	-	-	-	-
<i>Lpn1</i> Oxford	-	-	+	-

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; -: negativo; +: positivo.

El Mab de LPS-1 H no daba positivo con ninguna de las cepas problema. Por otro lado, todos los Mab de LPS-1 tampoco reconocían a estas muestras, indicando que se debía añadir otro Mab al sistema del conjugado y la línea.

Se probó entonces el Mab LPS-1 F en conjugado. Se dosificaron algunos cultivos en la membrana (puntos 1 µl/strip 4 mm) y se les pasó directamente conjugado de Mab de LPS-1 F y H a OD 4, con 90 µl DEV (15', POLCAS).

Tabla 5.6.5.2. Resultados del análisis de cepas en membrana con conjugados de LPS-1.

	<i>Lpn1</i> ¹ Knoxville	<i>Lpn1</i> Oxford
LPS-1 H OD 4	2/2+	0
LPS-1 F OD 4	2	<0.5

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Estos resultados coincidieron con el ensayo de inmunofluorescencia. Por ello se probó el Mab LPS-1 F con diferentes muestras para ver si mejoraba (90 µl tratados con NTP, 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C, POLCAS, 15'):

Tabla 5.6.5.3. Resultados del análisis de legionellas problema con Mab LPS-1 H y F.

	LPS-1 H OD ¹ 4	LPS-1 F OD 4
	LPS-1 AEF	LPS-1 AEF
<i>Lpn1</i> ² Camperdown	0	0,5-/0,5
<i>Lpn1</i> OLDA	0	<0.5
<i>Lpn1</i> Oxford	0	<0.5 color
<i>Lpn9</i>	0	1
<i>Lpn4</i>	0	0,5-
<i>Citrobacter</i>	0	0,5-

¹OD: densidad óptica; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

El Mab LPS-1 F reconocía a las muestras, así como a los cultivos pegados en la membrana pero era altamente inespecífico (ya se vio en cruces iniciales que F-F era muy inespecífico), por lo que no era la solución al problema.

Estudio de Mab no usados hasta el momento

Se decidió probar dos sobrenadantes de Mab que no se habían crecido inicialmente, el Mab LPS-1 I y el LPS-1 G. Estos sobrenadantes se evaluaron directamente por inmunofluorescencia buscando alguna señal positiva para purificarlos e incluirlos en el estudio. Se prepararon porta-objetos con *L. pneumophila* sg. 1 Camperdown, *L. pneumophila* sg. 1 OLDA, *L. pneumophila* sg. 1 Bellingham, *L. pneumophila* sg. 1 Oxford, *L. pneumophila* sg. 1 Heysham, *L. pneumophila* sg. 1 France, *L. pneumophila* sg. 1 Cambridge, *E. coli* y *P. mirabilis* para probarlos con estos sobrenadantes de Mab. Como se muestra en la tabla siguiente el sobrenadante de Mab LPS-1 I reaccionaba con todas las *L. pneumophila* sg. 1 y no con las dos muestras negativas, mientras que el sobrenadante de Mab LPS-1 G no reaccionaba con las legionellas problemáticas.

Tabla 5.6.5.4. Resultados del análisis por inmunofluorescencia de sobrenadantes de Mab LPS-1 G e I con cepas de *Legionella* problemáticas.

	Mab LPS-1 G	Mab LPS-1 I
<i>Lpn1</i> ¹ Camperdown	-	+
<i>Lpn1</i> OLDA	-	+
<i>Lpn1</i> Bellingham	-	+
<i>Lpn1</i> Oxford	-	+
<i>Lpn1</i> Heysham	-	+
<i>Lpn1</i> France	+	+
<i>Lpn1</i> Cambridge	+	+
<i>E. coli</i>	-	-
<i>P. mirabilis</i>	-	-

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; -: negativo; +: positivo.

Por tanto se decidió crecer y purificar el Mab LPS-1 I y se realizó el mismo proceso que con todos los demás Mab, en cuanto a purificación, pegado al oro y dosificación en membranas, cuyos datos se han reflejado en el apartado 5.2., 5.4. y 5.5.

Se probó entonces este Mab en membrana con conjugado de LPS-1 I a OD 2 y OD 4 sin tratar (el LPS-1 se encuentra en la superficie y se puede detectar sin tratamiento).

Tabla 5.6.5.5. Resultados del análisis de legionellas problema con Mab LPS-1 I.

	LPS-1 I OD ¹ 2	
	LPS-1 I 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>Lpn1² Philadelphia</i>	3	2/2+
<i>E. coli</i>	0	sombra
<i>Lpn1 Oxford</i>	3	0,5
<i>Lpn1 OLDA</i>	1+/2-	NA ³
<i>Lpn1 Camperdown</i>	3	NA
<i>Lpn1 Bellingham</i>	3-/3	NA
	LPS-1 I OD 4	
	LPS-1 I 1 mg/ml	LPS-1 AEF
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	3/3+	2+/3-
<i>E. coli</i>	<0.5	<0.5
<i>Lpn1 Oxford</i>	3+	1-/1

¹OD: densidad óptica; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ³NA: no analizado.

Se observó que el Mab LPS-1 I reconocía también en inmunocromatografía a las cepas como en el ensayo de inmunofluorescencia y que si no se encontraba en la membrana, la señal era mucho menor, ya que I-AEF no daba como I-I, por lo que se tituló e incluyó en la mezcla de LPS-1 en membrana a 0.25 mg/ml. Esta mezcla se denominó LPS-1 AEFI. En el conjugado se incluyó también por tanto, siendo entonces la OD 3 (H OD 1 + I OD 2).

5.6.6. Línea de Especie

El Mab para la línea de especie se adquirió a la ATCC (HB8472TM, LP3IIG2). Se creció en Vircell, S.L. y se trató y purificó como el resto de Mab analizados. Una vez conjugado al oro y dosificado en la membrana, se valoró en las condiciones en las que se encontraba la investigación en ese momento. La primera idea fue incluirlo en el strip de SR1. Se le denominó Mab LPN por ser para la detección de *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15.

Estudio de la funcionalidad de Mab en línea y conjugado

Se probó el conjugado de Mab LPN a OD 4 con la línea de Mab LPN a 1 mg/ml con FNTF 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C y sin tratar (90 µl, POL, 15’):

Tabla 5.6.6.1. Resultados del análisis de Mab LPN con muestra tratada y no tratada.

	NO TRATADA	TRATADA
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	sombra	0
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	<0.5	0,5+/1-

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Si la muestra no se trataba no daba prácticamente nada, por lo que necesitaba tratamiento.

Estudio de la rotura de la membrana de la bacteria

Métodos de Rotura Química

Se probaron algunas legionellas para ver cuál era el resultado tratando la muestra como en el caso desarrollado para GÉN y SR1:

Tabla 5.6.6.2. Resultados del análisis de muestras tratadas con FNTPE con Mab LPN.

	LPN 1 mg/ml
<i>Lpn¹6</i>	sombra
<i>Lpn11</i>	0,5/0,5+
<i>Lpn13</i>	<0.5
<i>Lpn14</i>	1+/2-

¹Lpn: *L. pneumophila*.

No todas las cepas de *L. pneumophila* probadas se veían aun habiendo tratado la muestra.

EDTA

Se decidió estudiar el medio NTP comparado con FNTPE con el aditivo EDTA, que recomienda la bibliografía^{33, 52, 64, 67, 151}, ya que éste puede mejorar la completa exposición del antígeno a los Mab. Se probó una condición con EDTA 10 mM para ver si había algún efecto añadido al FNTPE con 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C (90 µl, POL, 15', LPN OD 2):

Tabla 5.6.6.3. Resultados del análisis de muestras tratadas con NTP y FNTPE.

FNTPE	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	<0.5
NTP	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	2-
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	2

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Luego el EDTA eliminaba fondos, pero también la señal positiva en esta condición y el medio NTP era inespecífico con la muestra negativa.

Detergentes y EDTA

Se probó entonces otro tipo de detergente, el aniónico AD⁶⁷. Éste se testó al 1% con EDTA 10 mM en paralelo a sólo EDTA 10 mM, con 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C (90 µl, POL, 15', LPN OD 2).

Tabla 5.6.6.4. Resultados del análisis de detergente aniónico con EDTA 10 mM.

	EDTA	EDTA-AD ¹	AD
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	3+	<0.5	0
<i>LpnI</i> ² <i>Philadelphia</i>	3+	2/2+	0,5+

¹AD: ácido deoxicolato; ²LpnI: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Por tanto, parecía que al añadir un detergente aniónico se mejoraba el sistema y aumentaba la señal y más si llevaba la combinación de EDTA. Ambos componentes por separado no iban igual que juntos. Se probó entonces menor cantidad de EDTA (1 mM) con AD 1% y la combinación de FNTP para ver si se podía añadir al medio ya desarrollado (5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C, POL, 15', 90 µl):

Tabla 5.6.6.5. Resultados del análisis del medio FNTP con la adición de EDTA y AD.

	EDTA-AD ¹	FNTP ²	FNTP-EDTA-AD
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>LpnI</i> ³ <i>Philadelphia</i>	1+/2-	0,5/0,5+	1+/2-

¹AD: ácido deoxicolato; ²FNTP: mezcla de NaCl, Tween[®]-20 y sulfato de Polimixina-B tamponada con fosfato pH 7.2; ³LpnI: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Luego se podían mezclar porque rompía y no se había hecho más inespecífico. Se vio entonces diferentes cantidades de AD del 1 al 4 %, manteniendo EDTA 1 mM.

Tabla 5.6.6.6. Resultados del análisis de FNTP con EDTA y diferentes cantidades de AD.

	EDTA-AD ¹ 1	EDTA-AD 2	EDTA-AD 4
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>LpnI</i> ² <i>Philadelphia</i>	2-	2/2+	2/2+

¹AD: ácido deoxicolato; ²LpnI: *L. pneumophila* serogrupo 1.

5. RESULTADOS

Luego mayor cantidad de AD no mejoraba más que 1 %.

Por otro lado, siguiendo nuevamente las recomendaciones en la bibliografía^{60, 67} se probó el detergente NL, también aniónico, porque el AD agregaba parcialmente el medio. Se probó al 1 % para empezar con EDTA 1 mM y solo (90 µl, 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C, POL, 15’):

Tabla 5.6.6.7. Resultados del análisis con detergente aniónico NL y NL-EDTA.

	NL ¹	NL-EDTA
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Lpn1</i> ² <i>Philadelphia</i>	0	0,5+/0,5

¹NL: N-laurilsarcosina; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Se vio entonces que debía combinarse con EDTA para obtenerse señal. Se probaron distintos tantos por ciento con EDTA 1mM:

Tabla 5.6.6.8. Resultados del análisis de EDTA con diferentes cantidades de NL.

	EDTA-NL ¹ 1	EDTA-NL 2	EDTA-NL 4
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1</i> ² <i>Philadelphia</i>	0,5+	1/1+	2+/3-
	EDTA-NL 8	EDTA-NL 10	
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml	
<i>E. coli</i>	0	0	
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	2+/3-	3-	

¹NL: N-laurilsarcosina; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Al aumentar el tanto por ciento de NL aumentaba la señal y no se hacía inespecífico, por lo que con NL 2 ó 4 % con EDTA 1mM se mejoraba a los resultados obtenidos con AD.

Se dosificaron entonces NL y EDTA en el pad de muestra para que las concentraciones finales de reacción equivaliesen a las del medio (EDTA 2.82 mM para 1 mM final y NL 11.28 % para 2 % final) y otros tantos por ciento para probarlos, porque se tenía la experiencia de que el efecto es más acentuado en el pad que en formato líquido. Se prepararon también 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 % finales. A éstos se añadieron tres condiciones más: 0.085, 0.099 y 0.113 %). Se probaron con medio FNTP, 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C (90 µl, 15’):

Tabla 5.6.6.9. Resultados del análisis de diferentes cantidades de NL en el pad de muestra.

	EDTA-NL¹ 4	EDTA-NL 3	EDTA-NL 2
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1² Philadelphia</i>	3+	3	3/3+
	EDTA-NL 1	EDTA-NL 0,5	EDTA-NL 0,25
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	3	3	3
	EDTA-NL 0,125	EDTA-NL 0,0625	
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml	
<i>E. coli</i>	0	0	
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	3	1	
	EDTA-NL 0,085	EDTA-NL 0,099	EDTA-NL 0,113
	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	sombra	0	<0.5
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	2	3+	2+

¹NL: N-laurilsarcosina; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Entonces con EDTA 1mM y NL 0.25 % (POLENL) (final, 0.71 % para dosificar) se obtenía una señal apropiada.

Evaluación inicial de muestras

Se probaron diferentes muestras.

Tabla 5.6.6.10. Resultados del análisis de diferentes cepas con pad de muestra tratado con EDTA y NL con medio FNTP.

	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	2-
<i>Salmonella</i>	0
<i>Lpn²5</i>	1
<i>Lpn1 Oxford</i>	1+

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ²Lpn: *L. pneumophila*.

En principio no parecía inespecífico y sí se detectaban *L. pneumophila* sg. 5 y *L. pneumophila* sg. 1 Oxford.

Se pasó a estudiar las tres líneas entonces con estos medios y pads.

5.6.7. Líneas Género, Serogrupo 1 y Especie

Evaluación inicial de muestras

En este punto de la investigación ya se tenían las tres líneas bastante desarrolladas y de momento todas ellas usarían FNTTP como medio y diferentes pads de muestra. Con este sistema se valoraron nuevas legionellas del grupo I que se habían crecido en el laboratorio. Se siguió con 5 minutos a TA + 5 minutos a 95 °C y 15 minutos de test (POLCAS para GÉN y SR1 y POLENL para ESP, BCD OD 6, HI OD 3, LPN OD 2).

Tabla 5.6.7.1. Resultados de la valoración inicial de muestras con las tres líneas.

	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEFI	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1¹ Philadelphia</i>	2	1	2
<i>L. oakridgensis</i>	2	0	0
<i>L. taurinensis</i>	1+	0	0
<i>L. sainthelensi</i>	1+	0	0
<i>L. rubrilucens</i>	1	0	0
<i>L. cincinnatensis</i>	2	0	0
<i>L: quinlivanii</i>	1+	0	0
<i>L. spirithensis</i>	0,5+/1-	0	0
<i>L. anisa</i>	0,5	0	0

¹Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Luego el sistema había funcionado de forma correcta y las nuevas legionellas eran clasificadas apropiadamente.

Estudio del tiempo de reacción

El protocolo hasta ahora había sido la incubación 5 minutos a TA+ 5 minutos a 95 °C, pero se estudiaron diferentes tiempos. Se probaron 5, 10 y 15 minutos a 95 °C sin incubación a TA (mismas condiciones anteriores de pads y volúmenes):

Tabla 5.6.7.2. Resultados de la comparación de diferentes tiempos y temperaturas de incubación de las muestras.

5' TA ¹ + 5' 95 °C			
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEFI	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1</i> ² <i>Philadelphia</i>	1+/2-	1+	2
<i>Lpn</i> ³ 5	1+	0	1+
<i>Xantomonas</i>	0	0	0
5' 95 °C			
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEFI	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	2	1+	2-/2
<i>Lpn5</i>	2-	sombra	1
<i>Xantomonas</i>	0	sombra	0
10' 95 °C			
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEFI	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	2/2+	1+/2-	2
<i>Lpn5</i>	2/2+	0	1
<i>Xantomonas</i>	sombra	sombra	0
15' 95 °C			
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEFI	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	sombra	0
<i>Lpn1 Philadelphia</i>	2+	1+/2-	2-
<i>Lpn5</i>	2+	0	1
<i>Xantomonas</i>	0	sombra	0

¹TA: temperatura ambiente; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ³Lpn: *L. pneumophila*.

Se vio que podría sólo incubarse con calor sin tener que hacer el paso de TA, sobre 5-10 minutos. Se probaron las legionellas problema de GÉN a estos tiempos y se eligió 10 minutos porque la señal era mayor, como se ve en la siguiente tabla.

Tabla 5.6.7.3. Resultados de la incubación a mayor tiempo sin paso de incubación a TA con legionellas problema en la línea de género.

	5' 95 °C	10' 95 °C
	LPPA E 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml
<i>L. bozemanii</i> sg. ¹ 1	0,5/0,5+	1-
<i>L. bozemanii</i> sg. 2	1	1+
<i>L. gormanii</i>	0,5	0,5

sg.: serogrupo.

5. RESULTADOS

Estudio de la combinación de líneas y conjugados

Se probó a cruzar los pads entre sí y se vio que con GÉN y ESP había reacción cruzada, por lo que estas líneas no podrían ir juntas, mientras que SR1 y ESP sí (resultados no mostrados). Por ello se dosificó el conjugado SR1 con el de ESP, es decir HI+LPN, con una OD final de 5 (OD1+OD2+OD2) y un pad con todos los componentes de SR1 y ESP: POLCASENL. Estas mezclas se probaron con las líneas de SR1 y ESP (90 µl, FNTP, 10 minutos a 95 °C):

Tabla 5.6.7.4. Resultados de la comparación de diferentes pads de muestra para las líneas de serogrupo 1 y especie.

	POLCAS ¹	POLCASENL ²	POLCAS	POLCASENL
	LPS-1 AEFI	LPS-1 AEFI	LPN 1 mg/ml	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	0	0	<0.5	sombra
<i>Lpn1</i> ³	1+/2-	1+	1+	2/2+
<i>Lpn</i> ⁴⁵	0	0	1-	1/1+

¹POLCAS: poliéster bloqueado con caseína; ²POLCASENL: poliéster bloqueado con caseína, EDTA y N-laurilsarcosina; ³Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ⁴Lpn1: *L. pneumophila*.

Luego el sistema parecía que podría funcionar con un pad con combinación de los detergentes, sales y bloqueantes que ambas líneas necesitan por separado.

Estudio de procedencia de la muestra

Con el sistema que se había optimizado hasta el momento, se evaluaron las muestras del grupo I que habían dado problemas en el desarrollo del test directamente crecidas desde placas, y algunas de origen ambiental del grupo II para comprobar su funcionamiento.

Las muestras preparadas a McF1 poseían distinta turbidez que recogidas desde placa, que era mayor, y el procedimiento real del test sería desde placa, por lo que se realizó el experimento recogiendo las colonias vivas con la intención de comprobar cómo afectaba también mayor cantidad de muestra de la estudiada para el desarrollo (McF1).

Tabla 5.6.7.5. Resultados del análisis de diferentes cantidades de colonias vivas directas desde placas de cultivo a diferentes tiempos con el sistema final con cepas problemáticas del grupo I y ambientales del grupo II.

2 col ¹ /200 µl	15 minutos			30 minutos		
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPN 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPN 1 mg/ml
<i>I. bozemanii</i> sg. ² 1	1+	0	0	1+/2-	0	0
<i>L. bozemanii</i> sg.2	2/2+	0	0	2+	0	sombra
<i>L. gormanii</i>	2	sombra	0	2	0	0
<i>Lpn1</i> ³ Philadelphia	3+	2+/3-	3	3+	2+/3	3
<i>Lpn1</i> Oxford	3	2	3	3+	2	3
<i>Lpn1</i> OLDA	3	1+	3-/3	3	1+	3
<i>Lpn1</i> Bellingham	1-/1	0.5+/1-	2	1/1+	1-	2
<i>Lpn1</i> Camperdown	3+	3-	3	3+	3-	3/3+
1643.1 B	0	0	0	sombra	sombra	0
2 col ¹ /200 µl	15 minutos			30 minutos		
	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPN 1 mg/ml	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPN 1 mg/ml
1727.4	0	0	0	0	0	0
1788.2 A	0	0	0	0	0	sombra
1865.1 A	0	0	0	0	0	0
2069.1 S1	3	1	2+/3-	3	1	2+/3-
1420.3 S2_14	3	0	3-	3+	0	2+
2069.2 S1	3	2-/2	2+/3-	3+	2-/2	2+/3-
1419.3 S2_14	3	0	3-	3/3+	0	3-

¹col: colonias; ²sg.: serogrupo; ³Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1.

Lo que se pudo comprobar es que el sistema funcionaba correctamente y que los negativos seguían siéndolo, incluso a más cantidad de bacterias que McF1. Por otro lado se comprobó que 15 minutos era un tiempo adecuado, ya que el doble no mejoraba el resultado y aparecían mayor número de sombras.

Por este motivo, se evaluaron una serie de cepas negativas a McF4 (A60: 0.6-0.7). El resultado se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5.6.7.6. Resultados del análisis de muestras negativas a McFarland 4.

	LPPA E 1 mg/ml	LPS-1 AEF	LPN 1 mg/ml
<i>E. coli</i>	sombra	0	0
<i>Xantomonas</i>	0	0	0
<i>P. mirabilis</i>	0	0	0
<i>Ps. aeruginosa</i>	0	sombra	0
<i>Aeromonas</i>	0	0	0
<i>Citrobacter</i>	0	0	0
<i>B. cereus</i>	sombra	0	0
<i>Serratia</i>	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	sombra
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0
<i>Salmonella</i>	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	0	0	0

El resultado fue negativo para todos los cultivos, aunque algunos daban sombras, lo que unido al resultado de la tabla anterior, demostraba que el sistema era muy específico incluso con alta cantidad de muestra.

El sistema quedó por tanto como sigue:

Tabla 5.6.7.7. Composición del sistema final determinada para el test desarrollado.

(LPPA E: monoclonal de LPPA E; LPS-1 AEFI: mezcla de monoclonales de LPS-1 A, E, F e I; LPN: monoclonal LPN de especie; LPPA BCD: mezcla de monoclonales de LPPA B, C y D; LPS-1 HI-LPN: mezcla de monoclonales de monoclonales H e I y monoclonal LPN de especie; POLCAS: poliéster bloqueado con caseína; POLCASENL: poliéster bloqueado con caseína, EDTA y N-laurilsarcosina; FNTP: mezcla de NaCl, Tween[®]-20 y sulfato de Polimixina-B tamponado con fosfato pH 7.2).

	LÍNEA	CONJUGADO	PAD	MEDIO	INCUBACIÓN
GÉNERO	LPPA E	LPPA BCD	POLCAS	FNTP	10 minutos a 95 °C
SEROGRUPO1	LPS-1 AEFI	LPS-1 HI-LPN	POLCASENL		
ESPECIE	LPN				

Con este sistema se evaluarían todas las muestras de las que se disponía: grupos I, II y III.

5.7. Resultados Obtenidos por Inmunocromatografía

Las muestras se analizaron a partir de las suspensiones preparadas a McF1 (A600:0.25). Esta condición fue considerada como la límite a la que todas las cepas debían de dar positivo. El método real, la recogida de dos colonias típicas de 1-3 mm, conllevaba suspensiones con A600 mayor que a McF1, por lo que se aseguró la respuesta del test para las colonias que se testen por el mismo. Dado el gran número de muestras y trabajo a realizar fue el método más sencillo, fiable y práctico de conservarlas.

Los resultados del test, así como las lecturas visuales se muestran en las tablas 5.7.2. y 5.7.3. La interpretación de los posibles resultados se muestra en la tabla 5.7.1.

Como ejemplo se puede consultar la figura 5.7.1., donde se observan los posibles resultados que se pueden obtener para el test y su interpretación.

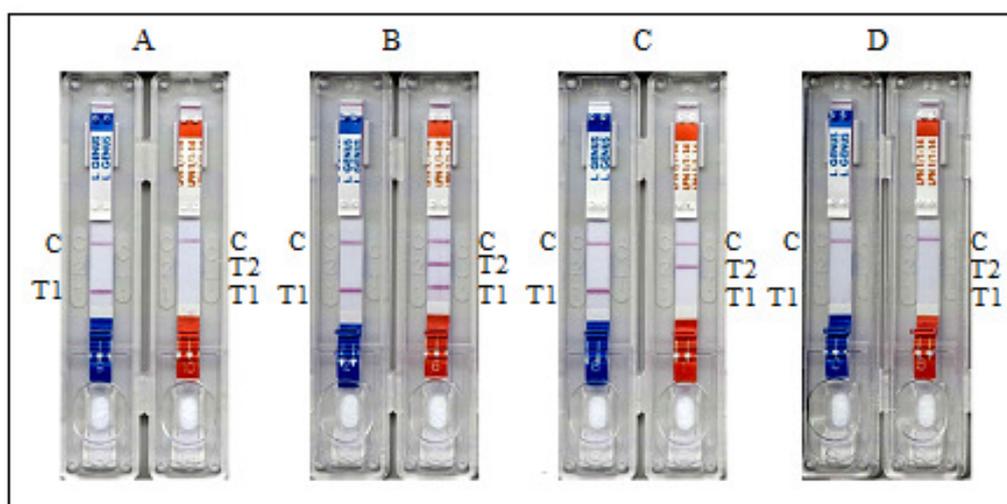


Figura 5.7.1. Resultados posibles que pueden obtenerse para el test inmunocromatográfico diseñado.

A: *Legionella* género; **B:** *Legionella pneumophila* serogrupo 1; **C:** *Legionella pneumophila* serogrupos 2-15; **D:** negativo para *Legionella*.

(strip azul: dos líneas (T1 = línea de género *Legionella*, C = línea control); strip naranja: tres líneas (T1 = línea *L. pneumophila* sg. 1, T2 = línea *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15, C = línea control).

5. RESULTADOS

Tabla 5.7.1. Interpretación de resultados del test inmunocromatográfico diseñado.

Línea GÉN ¹	Línea SR1 ²	Línea ESP ³	LÍNEA CONTROL	INTERPRETACIÓN
-	-	-	+	Negativo a <i>Legionella</i>
+	+	+	+	<i>L. pneumophila</i> sg⁴. 1
+	-	+	+	<i>L. pneumophila</i> sg. 2 a 15
+	-	-	+	Género <i>Legionella</i>
-	+	+	+	Inválido
-	+	-	+	Inválido
-	-	+	+	Inválido
+	+	-	+	Inválido
- ó +	- ó +	- ó +	-	Inválido

¹GÉN: línea de género *Legionella*, ²SR1: línea de *L. pneumophila* sg. 1, ³ESP: línea de *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15, ⁴sg.: serogrupo.

Tabla 5.7.2. Resultados obtenidos por el test inmunocromatográfico diseñado de las muestras de Grupos I, II y III

(se muestran los resultados de cepas del grupo I y las positivas del grupo II y grupo III. Los resultados del grupo II y grupo III negativos se han omitido por ser todos iguales. Puede verse como muestra el ejemplo D de la Figura 5.7.1.). *Lpn1*: *L. pneumophila* serogrupo 1; *Lpn*: *L. pneumophila*. Consultar la tabla 5.7.3.

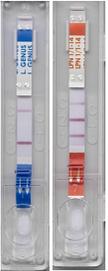
<p>Lpn1 Heysham</p>		<p>Lpn1 Benidorm</p>		<p>Lpn1 Camperdown</p>		<p>Lpn1 Kingston</p>	
<p>Lpn1 Bellingham</p>		<p>Lpn1 Knoxville</p>		<p>Lpn1 Allentown</p>		<p>Lpn1 France</p>	

5. RESULTADOS

Lpn 9		Lpn 5		Lpn 1 Cambridge		Lpn 1 OLDA	
Lpn 10		Lpn 6		Lpn 2		Lpn 1 Pontiac	
Lpn 11		Lpn 7		Lpn 3		Lpn 1 Oxford	
Lpn 12		Lpn 8		Lpn 4		Lpn 1 Philadelphia	

<i>L. micdadei</i>		<i>L. longbeachae</i> 2		Lpn 13	
<i>L. gormanii</i>		<i>L. bozemanii</i> 1		Lpn 14	
<i>L. oakridgensis</i>		<i>L. bozemanii</i> 2		Lpn 15	
<i>L. taurinensis</i>		<i>L. dumoffi</i>		<i>L. longbeachae</i> 1	

5. RESULTADOS

<p>1864.1 A(izquierda) y B(derecha)</p>		<p><i>L. spirithensis</i></p> 	<p><i>L. sainthelehsi</i></p> 
<p>1920.2 B</p>		<p><i>L. anisa</i></p> 	<p><i>L. rubrilucens</i></p> 
<p>1419.1 S2_14</p>		<p>1727.1 S1 aislamiento</p> 	<p><i>L. cincinnatiensis</i></p> 
<p>1420.3 S2_14</p>		<p>1808.8 B</p> 	<p><i>L. quinivani</i></p> 

<p>2871.3</p>	<p>2871.3 AISLAMIENTO</p>	<p>2069.1 S1</p>
		
<p>3187.1</p>	<p>2161.3 0.1</p>	<p>2069.2 S1 A</p>
		
<p>3469.3</p>	<p>2739.1</p>	<p>1419.3 S2_14+otras A(izquierda) y B(derecha)</p>
		
<p>2739.2</p>	<p>2766.1</p>	<p>1849.1 B (izq.), C (centro) y D (der.)</p>
		

5. RESULTADOS

<p>2825.1 B</p>		<p>2337.1</p>	<p>2870.2 AISLAMIENTO</p> 
<p>3129.1 C</p>		<p>3469.1 A(izquierda) y B(derecha)</p>	<p>2925.2</p> 
<p>2768.2 A(izquierda) y C(derecha)</p>		<p>3156.2 A</p> 	<p>2739.4</p> 
<p>Lpn1 Murcia</p>		<p>2738.1 D</p> 	<p>3468.2</p> 

Tabla 5.7.3. Lectura visual de los test inmunocromatográficos realizados e interpretación.

SR 1: *L. pneumophila* serogrupo 1, SR 2-15: *L. pneumophila* serogrupos 2 a 15, GÉN: género *Legionella*, NOL: no *Legionella*.

GRUPO I, **GRUPO II** y **GRUPO III**.

COLONIA	LECTURA VISUAL de la línea GÉNERO	INTERPRETACIÓN de la línea GÉNERO	LECTURA VISUAL de la línea SEROGRUPO 1	INTERPRETACIÓN de la línea SEROGRUPO 1	LECTURA VISUAL de la línea ESPECIE	INTERPRETACIÓN de la línea ESPECIE	REFERENCIA		
							TIPO COLONIA	TOTAL	
1	<i>L. pneumophila</i> 1 Heysham	1+/2-	POSITIVO	1+	POSITIVO	1+	POSITIVO	SR 1	1
2	<i>L. pneumophila</i> 1 Benidorm	1+/2-	POSITIVO	2	POSITIVO	2-	POSITIVO	SR 1	2
3	<i>L. pneumophila</i> 1 Camperdown	2-	POSITIVO	1+/2-	POSITIVO	2	POSITIVO	SR 1	3
4	<i>L. pneumophila</i> 1 Kingston	1+/2-	POSITIVO	2+	POSITIVO	2+	POSITIVO	SR 1	4
5	<i>L. pneumophila</i> 1 Bellingham	2-	POSITIVO	1+	POSITIVO	2	POSITIVO	SR 1	5
6	<i>L. pneumophila</i> 1 Knoxville	2	POSITIVO	2+	POSITIVO	1+	POSITIVO	SR 1	6
7	<i>L. pneumophila</i> 1 Allentown	2-	POSITIVO	2+	POSITIVO	2-	POSITIVO	SR 1	7
8	<i>L. pneumophila</i> 1 France	2-/2	POSITIVO	2-/2	POSITIVO	2	POSITIVO	SR 1	8
9	<i>L. pneumophila</i> 1 OLDA	2	POSITIVO	1+/2-	POSITIVO	3-	POSITIVO	SR 1	9
10	<i>L. pneumophila</i> 1 Pontiac	1+/2-	POSITIVO	2+	POSITIVO	2-	POSITIVO	SR 1	10
11	<i>L. pneumophila</i> 1 Oxford	1+/2-	POSITIVO	1-/1	POSITIVO	2	POSITIVO	SR 1	11
12	<i>L. pneumophila</i> 1 Cambridge	2-	POSITIVO	2/2+	POSITIVO	2+/3-	POSITIVO	SR 1	12
13	<i>L. pneumophila</i> 1 Philadelphia	1+/2-	POSITIVO	2-/2	POSITIVO	2+	POSITIVO	SR 1	13
14	<i>L. pneumophila</i> 2	2/2+	POSITIVO	0	NEGATIVO	2+	POSITIVO	SR 2-15	1
15	<i>L. pneumophila</i> 3	2	POSITIVO	0	NEGATIVO	1-	POSITIVO	SR 2-15	2
16	<i>L. pneumophila</i> 4	2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	2-	POSITIVO	SR 2-15	3
17	<i>L. pneumophila</i> 5	2-/2	POSITIVO	0	NEGATIVO	2-	POSITIVO	SR 2-15	4
18	<i>L. pneumophila</i> 6	1+/2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	2-	POSITIVO	SR 2-15	5

5. RESULTADOS

Tabla 5.7.3. Continuación

COLONIA		LECTURA VISUAL de la línea GÉNERO	INTERPRETACIÓN de la línea GÉNERO	LECTURA VISUAL de la línea SEROGRUPO 1	INTERPRETACIÓN de la línea SEROGRUPO 1	LECTURA VISUAL de la línea ESPECIE	INTERPRETACIÓN de la línea ESPECIE	REFERENCIA	
								TIPO COLONIA	TOTAL
19	<i>L. pneumophila 7</i>	2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	2	POSITIVO	SR 2-15	6
20	<i>L. pneumophila 8</i>	1+/2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	2	POSITIVO	SR 2-15	7
21	<i>L. pneumophila 9</i>	2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	2+	POSITIVO	SR 2-15	8
22	<i>L. pneumophila 10</i>	2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	2-	POSITIVO	SR 2-15	9
23	<i>L. pneumophila 11</i>	2-/2	POSITIVO	0	NEGATIVO	1+/2-	POSITIVO	SR 2-15	10
24	<i>L. pneumophila 12</i>	2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	2+	POSITIVO	SR 2-15	11
25	<i>L. pneumophila 13</i>	2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	2-	POSITIVO	SR 2-15	12
26	<i>L. pneumophila 14</i>	2-/2	POSITIVO	0	NEGATIVO	2-	POSITIVO	SR 2-15	13
27	<i>L. pneumophila 15</i>	2-/2	POSITIVO	0	NEGATIVO	2-	POSITIVO	SR 2-15	14
28	<i>L. longbeachae 1</i>	2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	1
29	<i>L. longbeachae 2</i>	2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	2
30	<i>L. bozemanii 1</i>	1+/2-	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	3
31	<i>L. bozemanii 2</i>	2+/3-	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	4
32	<i>L. dumoffi</i>	2-/2	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	5
33	<i>L. micdadei</i>	1+	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	6
34	<i>L. gormanii</i>	2+/3-	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	7
35	<i>L. oakridgensis</i>	2	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	8
36	<i>L. taurinensis</i>	1+	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	9
37	<i>L. sainthelensi</i>	1+	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	10
38	<i>L. rubrilucens</i>	1	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	11
39	<i>L. cincinnatiensis</i>	2	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	12
40	<i>L. quinlivanii</i>	1+	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	13
41	<i>L. spirithensis</i>	1-	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	14
42	<i>L. anisa</i>	1	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	15
43	1605.3 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	1
44	1605.3 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	2
45	1605.3 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	3
46	1605.3 D	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	44
47	1727,1 SI aislamiento	2	POSITIVO	1-	POSITIVO	2	POSITIVO	SR 1	14
48	1728,1 spp A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	5
49	1728,1 spp B GRANDE	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	6

Tabla 5.7.3. Continuación

COLONIA	LECTURA VISUAL de la línea GÉNERO	INTERPRETACIÓN de la línea GÉNERO	LECTURA VISUAL de la línea SEROGRUPO 1	INTERPRETACIÓN de la línea SEROGRUPO 1	LECTURA VISUAL de la línea ESPECIE	INTERPRETACIÓN de la línea ESPECIE	REFERENCIA		
							TIPO COLONIA	TOTAL	
50	1728,1 SPP B PEQUEÑA	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	7
51	1800,8 A	0,25+	NEGATIVO	sombra	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	8
52	1800,8 B	0,5+/1-	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	16
53	1864,1 A	2	POSITIVO	0	NEGATIVO	2	POSITIVO	SR 2-15	15
54	1864,1 B	2	POSITIVO	0	NEGATIVO	2	POSITIVO	SR 2-15	16
55	1920,2 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	9
56	1920,2 B	3+	POSITIVO	2+	POSITIVO	2+/3-	POSITIVO	SR 1	15
57	1643,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	10
58	1643,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	11
59	1643,1 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	12
60	1643,1 D	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	13
61	1866,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	14
62	1866,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	15
63	1866,1 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	16
64	1866,1 D	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	17
65	1867,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	18
66	1867,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	19
67	1867,1 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	20
68	1866,2 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	21
69	1866,2 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	22
70	1866,2 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	23
71	1788,2 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	24
72	1788,2 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	25
73	1788,2 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	26
74	1419,1 S2_14	3	POSITIVO	0	NEGATIVO	2+	POSITIVO	SR 2-15	17
75	1865,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	27
76	1865,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	28
77	1865,1 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	29
78	1878,9	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	30
79	1785,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	31
80	1785,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	32
81	1971,12 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	33
82	1971,12 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	34

5. RESULTADOS

Tabla 5.7.3. Continuación

COLONIA		LECTURA VISUAL de la línea GÉNERO	INTERPRETACIÓN de la línea GÉNERO	LECTURA VISUAL de la línea SEROGRUPO 1	INTERPRETACIÓN de la línea SEROGRUPO 1	LECTURA VISUAL de la línea ESPECIE	INTERPRETACIÓN de la línea ESPECIE	REFERENCIA	
								TIPO COLONIA	TOTAL
83	1760,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	35
84	1760,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	36
85	1760,1 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	37
86	1760,1 D	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	38
87	1789,2 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	39
88	1789,2 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	40
89	1760,3 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	41
90	1760,3 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	42
91	172? A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	43
92	172? B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	44
93	172? C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	45
94	172? D	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	46
95	172? E	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	47
96	1762,4 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	48
97	1762,4 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	49
98	1729,2 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	50
99	1729,2 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	51
100	1729,2 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	52
101	1420,3 S2_14	3+	POSITIVO	0	NEGATIVO	2+/3-	POSITIVO	SR 2-15	18
102	1865,2 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	53
103	1865,2 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	54
104	1455,3A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	55
105	1455,3 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	56
106	2070,3 spp A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	57
107	2070,3 spp B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	58
108	2070,3 spp C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	59
109	2069,1 S1	2+/3-	POSITIVO	1+/2-	POSITIVO	3+	POSITIVO	SR 1	16
110	1868,1	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	60
111	1849,2 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	61
112	1849,2 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	62
113	1171,17 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	63
114	1171,17 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	64
115	1889,7 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	65
116	1889,7 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	66

Tabla 5.7.3. Continuación

COLONIA		LECTURA VISUAL de la línea GÉNERO	INTERPRETACIÓN de la línea GÉNERO	LECTURA VISUAL de la línea SEROGRUPO 1	INTERPRETACIÓN de la línea SEROGRUPO 1	LECTURA VISUAL de la línea ESPECIE	INTERPRETACIÓN de la línea ESPECIE	REFERENCIA	
								TIPO COLONIA	TOTAL
117	1920,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	67
118	1920,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	68
119	1920,1 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	69
120	1920,1 D	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	70
121	2069,2 SI A	3	POSITIVO	1+/2-	POSITIVO	2+	POSITIVO	SR 1	17
122	2069,2 SI B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	71
123	1486,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	72
124	1486,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	73
125	1486,1 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	74
126	1516,4 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	75
127	1516,4 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	76
128	1728,6 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	77
129	1728,6 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	78
130	1728,6 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	79
131	1727,4	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	80
132	1757,1 TT A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	81
133	1757,1 TT B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	82
134	1757,1 TT C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	83
135	1907,3 6 u/c A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	84
136	1907,3 6 u/c B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	85
137	1455,1 pH 8 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	86
138	1727,3 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	87
139	1727,3 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	88
140	1727,3 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	89
141	1727,3 D	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	90
142	1727,3 E	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	91
143	1419,3 S2_14 + OTRAS A	2+	POSITIVO	0	NEGATIVO	2	POSITIVO	SR 2-15	19
144	1419,3 S2_14 + OTRAS B	3	POSITIVO	0	NEGATIVO	2+	POSITIVO	SR 2-15	20
145	1867,2 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	92
146	1867,2 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	93
147	1867,2 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	94
148	1849,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	95

5. RESULTADOS

Tabla 5.7.3. Continuación

COLONIA		LECTURA VISUAL de la línea GÉNERO	INTERPRETACIÓN de la línea GÉNERO	LECTURA VISUAL de la línea SEROGRUPO 1	INTERPRETACIÓN de la línea SEROGRUPO 1	LECTURA VISUAL de la línea ESPECIE	INTERPRETACIÓN de la línea ESPECIE	REFERENCIA	
								TIPO COLONIA	TOTAL
49	1849,1 B	3	POSITIVO	0	NEGATIVO	2+/3-	POSITIVO	SR 2-15	21
150	1849,1 C	3	POSITIVO	0	NEGATIVO	3	POSITIVO	SR 2-15	22
151	1849,1 D	1	POSITIVO	0	NEGATIVO	2	POSITIVO	SR 2-15	23
152	2871,3 AISLAMIENTO	2+	POSITIVO	0,5+/1-	POSITIVO	2+/3-	POSITIVO	SR 1	18
153	2161,3 0.1	3	POSITIVO	sombra	NEGATIVO	2	POSITIVO	SR 2-15	24
154	2739,1	2+	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	17
155	2766,1	3+	POSITIVO	0	NEGATIVO	2+	POSITIVO	SR 2-15	25
156	2871,3	3	POSITIVO	2-/2	POSITIVO	2+/3-	POSITIVO	SR 1	19
157	3187,1	3	POSITIVO	0,25+	NEGATIVO	2+	POSITIVO	SR 1	20
158	3469,3	3	POSITIVO	1+	POSITIVO	2-/2	POSITIVO	SR 1	21
159	2739,2	2+	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	18
160	2870,2 AISLAMIENTO	3+	POSITIVO	2	POSITIVO	2+	POSITIVO	SR 1	22
161	2925,2	3	POSITIVO	1+/2-	POSITIVO	2	POSITIVO	SR 1	23
162	2739,4	3	POSITIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	GÉN	19
163	3468,2	3	POSITIVO	0,5/0,5+	POSITIVO	2+	POSITIVO	SR 1	24
164	2337,1	3	POSITIVO	0	NEGATIVO	2+/3-	POSITIVO	SR 2-15	26
165	3469,1 A	0,5+	POSITIVO	0	NEGATIVO	0,25-	NEGATIVO	GÉN	20
166	3469,1 B	3+	POSITIVO	1+/2-	POSITIVO	2	POSITIVO	SR 1	25
167	3156,2 A	3	POSITIVO	0,5+/1-	POSITIVO	2+/3-	POSITIVO	SR 1	26
168	3156,2 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	96
169	2738,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	97
170	2738,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	98
171	2738,1 C	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	99
172	2738,1 D	3	POSITIVO	2-	POSITIVO	2/2+	POSITIVO	SR 1	27
173	2925,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	100
174	2925,1 B	3	POSITIVO	1-	POSITIVO	3	POSITIVO	SR 1	28
175	3140,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	101
176	3140,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	102
177	3129,1 A	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	103
178	3129,1 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	104
179	3129,1 C	3	POSITIVO	0	NEGATIVO	3	POSITIVO	SR 2-15	27
180	2768,2 A	3	POSITIVO	1	POSITIVO	2+	POSITIVO	SR 1	29

Tabla 5.7.3. Continuación

COLONIA		LECTURA VISUAL de la línea GÉNERO	INTERPRETACIÓN de la línea GÉNERO	LECTURA VISUAL de la línea SEROGRUPO 1	INTERPRETACIÓN de la línea SEROGRUPO 1	LECTURA VISUAL de la línea ESPECIE	INTERPRETACIÓN de la línea ESPECIE	REFERENCIA	
								TIPO COLONIA	TOTAL
181	2768,2 B	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	105
182	2768,2 C	1+	POSITIVO	1-/1	POSITIVO	2+	POSITIVO	SR 1	30
183	2768,2 D	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	106
184	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (HNTJ1)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	107
185	<i>Salmonella</i> (HNTJ2)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	108
186	<i>Proteus mirabilis</i> (HNTJ3)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	109
187	<i>Xantomonas</i> (HNTJ4)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	110
188	<i>Aeromonas</i> (HNTJ5)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	111
189	<i>Enterobacter aerogenes</i> (HNTJ6)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	112
190	<i>Staphylococcus aureus</i> (HNTJ7)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	113
191	<i>Escherichia coli</i> (HNJT8)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	114
192	<i>Serratia</i> (HNTJ9)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	115
193	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (HNTJ10)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	116
194	<i>Bacillus cereus</i> (HNTJ11)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	117
195	<i>Klebsiella</i> (HNTJ12)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	118
196	<i>Citrobacter</i> (HNTJ13)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	119
197	<i>Pseudomonas sp. 1</i> (HNTJ14)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	120
198	<i>Pseudomonas sp. 2</i> (HNTJ15)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	121
199	<i>Pseudomonas sp. 3</i> (HNTJ16)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	122
200	<i>Pseudomonas sp. 4</i> (HNTJ17)	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	123

5. RESULTADOS

Tabla 5.7.3. Continuación

COLONIA		LECTURA VISUAL de la línea GÉNERO	INTERPRETACIÓN de la línea GÉNERO	LECTURA VISUAL de la línea SEROGRUPO 1	INTERPRETACIÓN de la línea SEROGRUPO 1	LECTURA VISUAL de la línea ESPECIE	INTERPRETACIÓN de la línea ESPECIE	REFERENCIA	
								TIPO COLONIA	TOTAL
201	<i>Aislado clínico Pseudomonas sp.1 (HNTJ18)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	124
202	<i>Aislado clínico Pseudomonas sp.2 (HNTJ19)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	125
203	<i>Aislado clínico Pseudomonas sp.3 (HNTJ20)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	126
204	<i>Aislado clínico Acinetobacter sp.(HNTJ21)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	127
205	<i>Staphylococcus aureus (HNTJ22)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	128
206	<i>Streptococcus viridans (HNTJ23)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	129
207	<i>Haemophilus sp (HNTJ24)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	130
208	<i>Streptococcus sp (HNTJ25)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	131
209	<i>Streptococcus sp (HNTJ26)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	132
210	<i>Aislado clínico Pseudomonas sp.4 (HNTJ27)</i>	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NOL	133
211	<i>L. pneumophila 1 Murcia</i>	2-	POSITIVO	2-	POSITIVO	2	POSITIVO	SR 1	31

Los resultados obtenidos fueron por tanto:

Tabla 5.7.4. Resumen de los resultados obtenidos para el análisis de las colonias por el test inmunocromatográfico desarrollado por línea y por grupo

GRUPO I	GÉN ¹	SR 1 ²	SR 2-15 ³
INDIVIDUAL ⁴	15	13	14
TOTAL ⁵	42	13	27 (SR 1-15)
GRUPO II	GÉN	SR 1	SR 2-15
INDIVIDUAL	5	16	14
TOTAL	35	16	30 (SR 1-15)
GRUPO III	GÉN	SR 1	SR 2-15
INDIVIDUAL	0	1	0
TOTAL	1	1	1 (SR 1-15)
GLOBAL	GÉN	SR 1	ESP ⁶
TOTAL TEST	78	30*	58
TOTAL REFERENCIA	78	31*	58

¹GÉN: género *Legionella*, ²SR 1: *L. pneumophila* sg. 1, ³SR 2-15: *L. pneumophila* serogrupos 2 a 15, ⁴INDIVIDUAL: para cada línea número de muestras positivas, ⁵TOTAL: para cada grupo cuántas muestras positivas hay para cada línea, ⁶ESP: resultados globales para la línea de *L. pneumophila* serogrupos 2 a 15 incluyendo las *L. pneumophila* sg. 1 que también reconoce.

*La muestra número 157 (3187.1) es negativa por la línea de sg. 1 por el test inmunocromatográfico, mientras que es positiva para dicha línea por el método de referencia.

5.8. Resultados de la Valoración por ELISA e Inmunofluorescencia de Cepas del Grupo II discrepantes

En el grupo II se obtuvo un resultado discrepante entre el método de referencia y el test inmunocromatográfico evaluado, como se refleja en la tabla 7.5.4. Para comprobar el resultado obtenido se analizó esta muestra discrepante, la 3187.1, junto con otras de colección por el test comercial Bartels ELISA *Legionella* Urinary Antigen (Trinity Biotech, USA) según las instrucciones del fabricante. También se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con los Mab de LPS-1 y un policlonal de conejo anti LPS-1 del que disponía la empresa (desarrollado en el laboratorio) con porta-objetos sensibilizados con las mismas cepas que se usaron como muestras para el ELISA con placa comercial. La muestra discrepante dio negativa por todos los ensayos realizados como se muestra en la tabla 5.8.1.

Tabla 5.8.1. Resultados del análisis de la cepa discrepante del grupo II con ensayos de ELISA e inmunofluorescencia.

	placa BARTELS	Mab LPS- 1 H	Mab LPS- 1 I	Mab LPS- 1 A	Mab LPS- 1 E	Mab LPS- 1 F	Mab LPN ATCC	Pab ³ anti LPS-1
2870,2	+	-	+	+	+	+	+	+
3187,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lpn5</i> ¹	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lpn1</i> ² Philadelphia	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. gormanii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lpn1</i> Oxford	-	-	+	-	-	+	+	+

¹Lpn5: *L. pneumophila* serogrupo 5; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ³Pab: anticuerpo policlonal anti LPS-1 de *Legionella pneumophila* serogrupo 1.

5.9. Tratamiento Estadístico de los Resultados del Análisis de Muestras con el Test Desarrollado

Como se comentó en la sección de métodos, para determinar la exactitud de un clasificador, en este caso un test de inmunocromatografía para la detección de *Legionella* en muestras (ambientales o humanas) provenientes de cultivos, es necesario el cálculo de diversos parámetros estadísticos.

Estos parámetros se han calculado para cada línea que compone el test por separado y para el conjunto total del ensayo, obteniendo así diferentes tablas de datos de doble entrada con las que poder calcular la sensibilidad, especificidad, valores predictivos (negativos y positivos), tasas de verosimilitud, índice de Youden y exactitud de cada uno de ellos.

Tabla 5.9.1. Tablas de doble entrada para cada grupo por líneas y global por líneas.

GRUPO I		GÉNERO		SEROGRUPO 1		ESPECIE				
		PREDICCIÓN CLASIFICADOR		PREDICCIÓN CLASIFICADOR		PREDICCIÓN CLASIFICADOR				
		POS ¹	NEG ²	POS	NEG	POS	NEG			
ESTADO REAL DE LA CONDICIÓN	P ³	42	0	42	13	0	13	27	0	27
	A ⁴	0	0	0	0	29	29	0	15	15
		42	0	42	13	29	42	27	15	42

Tabla 5.9.1. Continuación

		GÉNERO		SEROGRUPO 1		ESPECIE				
		PREDICCIÓN CLASIFICADOR		PREDICCIÓN CLASIFICADOR		PREDICCIÓN CLASIFICADOR				
GRUPO II		POS	NEG		POS	NEG		POS	NEG	
ESTADO REAL DE LA CONDICIÓN	P	35	0	35	16	1	17	30	0	30
	A	0	106	106	0	124	124	0	111	111
		35	106	141	16	125	141	30	111	141
GRUPO III		POS	NEG		POS	NEG		POS	NEG	
ESTADO REAL DE LA CONDICIÓN	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
	A	0	27	27	0	27	27	0	27	27
		1	27	28	1	27	28	1	27	28
GLOBAL		POS	NEG		POS	NEG		POS	NEG	
ESTADO REAL DE LA CONDICIÓN	P	78	0	78	30	1	31	58	0	58
	A	0	133	133	0	180	180	0	153	153
		78	133	211	30	181	211	58	153	211

¹POS: positivo, ²NEG: negativo, ³P: presencia, ⁴A: ausencia.

Tabla 5.9.2. Tabla de de doble entrada para el global del test.

GLOBAL		PREDICCIÓN CLASIFICADOR		
		POS ¹	NEG ²	
ESTADO REAL DE LA CONDICIÓN	P ³	77	1	78
	A ⁴	0	133	133
		77	134	211

¹POS: positivo, ²NEG: negativo, ³P: presencia, ⁴A: ausencia.

Por tanto, con los datos de las tablas 5.9.1. y 5.9.2. se pueden obtener los siguientes valores de sensibilidad y especificidad, valores predictivos y tasas de verosimilitud, que se han calculado con la herramienta Clinical Calculator 1 del sitio web <http://vassarstats.net/> y se ha añadido el índice de Youden y la exactitud (para los datos completos ver el ANEXO 3 de ANEXO RESULTADOS).

Tabla 5.9.3. Parámetros estadísticos obtenidos para las líneas del test desarrollado

	GÉN ¹	SR 1 ²	ESP ³
S ⁴ (%)	100,000	96,774	100,000
E ⁵ (%)	100,000	100,000	100,000
VPP ⁶ (%)	100,000	100,000	100,000
VPN ⁷ (%)	100,000	99,448	100,000
LRP ⁸	∞*	∞*	∞*
LRN ⁹	0,000	0,032	0,000
AC ¹⁰	1,000	0,995	1,000
γ ¹¹	1,000	0,968	1,000

¹GÉN: género *Legionella*, ²SR 1: *L. pneumophila* sg. 1, ³ESP: línea de *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15; ⁴S: sensibilidad, ⁵E: especificidad; ⁶VPP: valor predictivo positivo; ⁷VPN: valor predictivo negativo; ⁸LRP: tasa de verosimilitud positiva; ⁹LRN: tasa de verosimilitud negativa; ¹⁰AC: exactitud; ¹¹γ: índice de Youden, *∞: el resultado tiene a infinito.

Si se trasladan estos datos a la representación en una curva ROC se obtendría visualmente el rendimiento del test (clasificador) por líneas (los datos completos pueden verse en el ANEXO 4 de ANEXO RESULTADOS):

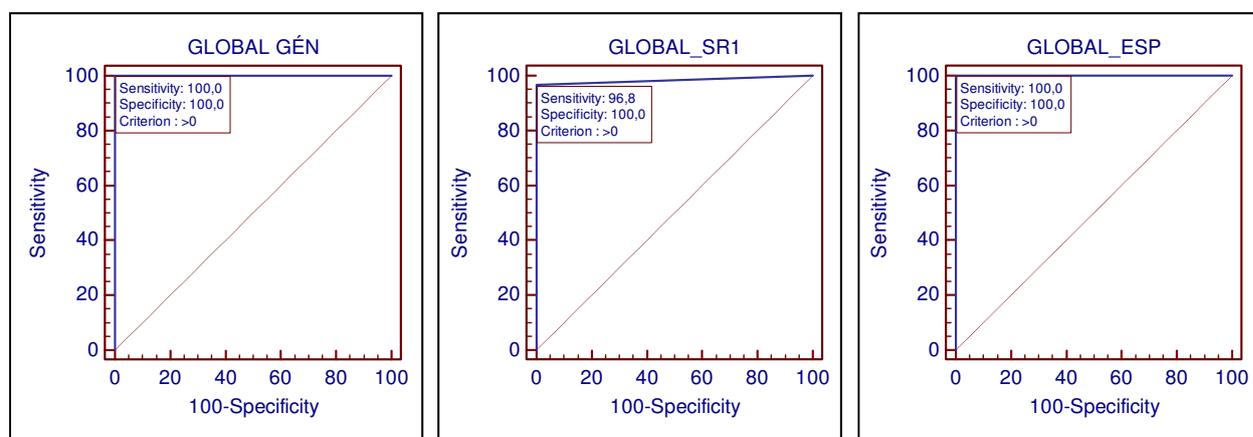


Figura 5.9.1. Curvas ROC obtenidas para los diferentes marcadores de los que se compone el test desarrollado.

(Área bajo la curva para la línea de género: 1, área bajo la curva para la línea de *L. pneumophila* sg. 1: 0.968, área bajo la curva para la línea de *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15: 1)

(representaciones obtenidas con el Software Medcalc[®] V 12.2.1.0 proporcionado por

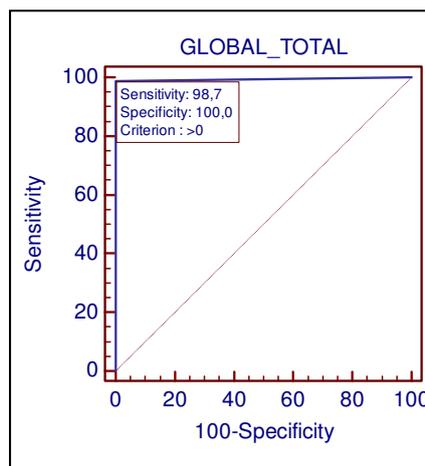
<http://www.medcalc.org>).

Para el total del test, teniendo en cuenta todas las muestras clasificadas como un único resultado correcto, se tienen los valores globales reflejados en la tabla 5.9.4. y la representación gráfica que se muestra en la figura 5.9.2.

Tabla 5.9.4. Parámetros estadísticos del test obtenidos considerándolo globalmente.

	TOTAL
S (%)	98,718
E (%)	100,000
VPP (%)	100,000
VPN (%)	99,254
LRP	∞^*
LRN	0,013
AC	0,995
γ	0,987

¹GÉN: género *Legionella*, ²SR 1: *L. pneumophila* sg. 1, ³ESP: línea de *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15; ⁴S: sensibilidad, ⁵E: especificidad; ⁶VPP: valor predictivo positivo; ⁷VPN: valor predictivo negativo; ⁸LRP: tasa de verosimilitud positiva; ⁹LRN: tasa de verosimilitud negativa; ¹⁰AC: exactitud; ¹¹ γ : índice de Youden, * ∞ : el resultado tiene a infinito.

**Figura 5.9.2. Curva ROC obtenida para el test desarrollado globalmente.**

(Área bajo la curva para el global: 0.987)

(representación obtenida con el Software Medcalc[®] V 12.2.1.0 proporcionado por <http://www.medcalc.org>).

5.10. Resultados del Cálculo del Límite de Detección de la Técnica

De las placas inoculadas con *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia se obtuvo que se podían contar colonias desde la dilución 1/100.000 (154 colonias) a la 1/10.000.000 (2 colonias). Para el cálculo se tomó el valor de la dilución 1/100.000, y aplicando la dilución preparada y dado que se pusieron 10 μ l de muestra por placa, se obtuvo que la dilución original (1x) tenía $1.54 \cdot 10^9$ unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml), lo que equivalía a aproximadamente

5. RESULTADOS

5 veces McF1 (A600: 0.25, $3 \cdot 10^8$ UFC/ml). Estas suspensiones se hirvieron y se midieron espectrofotométricamente.

Tabla 5.10.1. Medida espectrofotométrica de las suspensiones sembradas para el cálculo del límite de detección y sus resultados por el test desarrollado.

	A600 ¹	GÉN ²	SR 1 ³	ESP ⁴
1x	1,0460	NA ⁶	NA	NA
Dil.⁵ 1/10	0,0923	2	2	2-/2
Dil. 1/100	0,0259	2-/2	2/2+	0,5-
Dil. 1/1.000	0,0109*	0,25-	0,5+/1-	0
Dil. 1/10.000	-0,0030*	0	sombra	0
Dil. 1/100.000	0,0106*	NA	NA	NA
Dil. 1/10.000.000	0,0004*	NA	NA	NA
2 colonias/200 µl	NA	2+/3-	2/2+	2-

* medida fuera de rango del espectrofotómetro; ¹A600: absorbancia a 600 nm; ²GÉN: línea género *Legionella*, ³SR 1: *L. pneumophila* sg. 1, ⁴ESP: línea de *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15, ⁵DIL.: dilución; ⁶NA: no analizado.

El resultado de la evaluación por el test desarrollado de las suspensiones, proporcionó por tanto, el límite de detección:

Tabla 5.10.2. Límite de detección del test desarrollado por líneas.

GÉN ¹	SR 1 ²	ESP ³
Dil. ⁴ 1/100	Dil. 1/100	Dil. 1/10
~1/20 McF1	~1/20 McF1	~1/2 McF1
$1,54 \cdot 10^7$ UFC/ml⁵	$1,54 \cdot 10^7$ UFC/ml	$1,54 \cdot 10^8$ UFC/ml

¹GÉN: línea género *Legionella*, ²SR 1: *L. pneumophila* sg. 1, ³ESP: línea de *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15, ⁴DIL.: dilución; ⁵UFC/ml: unidades formadoras de colonias por mililitro.

5.11. Resultados de los Estudios de Estabilidad

Se realizaron estudios de estabilidad a los diferentes constituyentes del kit sometiéndolos a estrés térmico. Los resultados se comentan a continuación.

5.11.1. Estabilidad de los Strips

Para comprobar la estabilidad de las tiras, éstas fueron sometidas a un estrés térmico de una semana a 50 °C y se valoraron en paralelo a temperatura ambiente. Posteriormente, se evaluaron al año a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos fueron:

Tabla 5.11.1.1. Resultado de estrés térmico de strips y valoración a un año a temperatura ambiente

(la línea control no se muestra en la tabla y en todos los casos fue un valor de entre 2- y 2+).

	TA ¹			1 SEMANA a 50 °C			TA 1 AÑO		
	GÉNERO	SEROG. ⁵ 1	ESPECIE	GÉNERO	SEROG.1	ESPECIE	GÉNERO	SEROG.1	ESPECIE
Lpn1 ² Philadelphia	3-	2+	1+	3	2	1+/2-	2+/3-	2	2-
Lpn1 Oxford	3-	1+/2-	1+	3	0,5+/1-	2-	3	1+	1+/2-
<i>L. bozemanii</i> sg. ³ 1	2-/2	0	0	2	0	0	2+	0	0
Lpn ⁴ 3	2+/3-	0	0,5++	2+/3-	0	1	2+/3-	0	0,5+/1-
<i>Citrobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	sombra	0
<i>Ps. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	sombra

¹TA: temperatura ambiente; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ³sg.: serogrupo; ⁴Lpn: *L. pneumophila*; ⁵SEROG.: serogrupo.

5.11.2. Estabilidad del Medio

El medio FNTF liofilizado se estudió a 50 °C comparado a TA durante dos meses y posteriormente se probó tras 1 año reconstituido frente a uno recién reconstituido del mismo lote a TA. El resultado se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5.11.2.1. Resultados del test para la evaluación de muestras tratadas con medio sometido a estrés térmico. A: medio liofilizado sometido a 50 °C durante 1 y 2 meses y reconstituido para valoración, B: medio liofilizado reconstituido al año para valoración y medio liofilizado y reconstituido analizado tras 1 año a TA

(la línea control no se muestra en la tabla y en todos los casos fue un valor de entre 2- y 2+)

A	TA ¹			1 MES a 50 °C			2 MESES a 50 °C		
	GÉNERO	SEROG. ⁵ 1	ESPECIE	GÉNERO	SEROG.1	ESPECIE	GÉNERO	SEROG.1	ESPECIE
Lpn1 ² Philadelphia	2+/3-	2	2-	3-	2/2+	2/2+	2+/3-	2/2+	2
Lpn1 Oxford	3	1/1+	2-	3	2-	2/2+	3	2-	2
Lpn1 OLDA	3-	2-	2+	3	2-/2	2+	3-	2+	2+
Lpn1 Camperdown	3-	2-	2	3	2-	2+	2+/3-	2	2/2+
Lpn1 Bellingham	2+/3-	2-	2/2+	2+/3-	2	2/2+	2+/3-	2-	2+
<i>L. bozemanii</i> sg. ³ 1	1+	0	0	1++	0	0	1	0	0
<i>L. gormanii</i>	2+/3-	0	0	2+/3-	0	0	2-/2	0	sombra
Lpn ⁴ 15	2+/3-	0	2-	3	0	3-	3-	0	2+/3-
Lpn 7	3	0	2-	3	0	2+	3	0	2
Lpn 2	1-/1	0	1+	1	0	1+/2-	2-	0	1+/2-
<i>Aeromonas</i>	0	0	sombra	sombra	0	sombra	0	0	sombra
<i>Salmonella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	sombra	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. cereus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5. RESULTADOS

B	TA			1 AÑO RECONSTITUIDO A TA		
	GÉNERO	SEROG.1	ESPECIE	GÉNERO	SEROG.1	ESPECIE
Lpn 1 Philadelphia	2+/3-	2-/2	2	3	2	2
Lpn 1 Oxford	3	1-	2	3	1+	2+
<i>L. bozemanii</i> sr1	1-	0	0	1-/1	0	0
<i>L. bozemanii</i> sr2	2+	0	0	2	0	0
Lpn 15	3-	0	2+/3-	3	0	3-
<i>Aeromonas</i>	0	sombra	0	0	0	sombra
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0

¹TA: temperatura ambiente; ²Lpn1: *L. pneumophila* serogrupo 1; ³sg.: serogrupo; ⁴Lpn: *L. pneumophila*; ⁵SEROG.: serogrupo.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Desde que se descubrió *Legionella pneumophila* tras un brote en una convención de legionarios ocurrido en Philadelphia⁵, numerosos han sido los casos conocidos provocados por dicha bacteria^{13, 15-17}. De las diversas especies y serogrupos que forman la familia *Legionellaceae*, es *L. pneumophila* la que provoca el 90 % de las infecciones^{10, 21}, siendo de ellas *L. pneumophila* sg. 1 la causante del 70-80 % de las neumonías severas^{2, 22}. Otros serogrupos como el 2, 3, 4, 5 ó 6, u otras especies como *L. micdadei*, *L. dumoffi*, *L. bozemanii*, *L. feeli* o *L. longbeachae*, pueden causar también enfermedad pero son menos comunes^{10, 11}.

Entre los hábitats de la bacteria se encuentran los naturales como ríos, lagos, fuentes o lodos²³, o los sistemas creados por el hombre como circuitos de agua sanitaria, sitios de recreo (spa, piscinas, etc.) o torres de refrigeración²⁻⁴. El análisis de estos sistemas para determinar la presencia de *Legionella* es obligatorio en gran número de países^{22, 94, 152, 153}, lo que crea la necesidad de métodos de diagnóstico eficaces.

6.1. De la Morfología de la Membrana de *Legionella* y la Epidemiología y Patogénesis de la Infección por *Legionella pneumophila*

En la membrana de la bacteria *Legionella* se hallan diversos componentes con actividad antigénica que son específicos de género, especie o serogrupo^{20, 32, 33} (ver figura 1.1.3.1.). Estos componentes pueden ser útiles en el diagnóstico clínico de la bacteria porque permiten su identificación y clasificación en casos que así lo requieran.

Se ha visto que la **lipoproteína asociada al peptidoglicano (PAL ó LPPA)** muestra epítomos específicos para género. Este componente antigénico de la membrana es común y altamente conservado en todas las legionellas^{37, 38, 41}, lo que permitiría la detección del género *Legionella* en principio para todas las nuevas especies que surgiesen. En un trabajo no publicado de Rojas *et al.*¹³⁵, este antígeno se obtuvo como recombinante y fue inoculado en ratones a los que posteriormente se sangró para obtener suero. Estas muestras, así como sueros control de otras enfermedades (*Citomegalovirus*, *Leishmania* o del Síndrome respiratorio agudo severo (SARS)), se analizaron mediante la técnica de ELISA con placas sensibilizadas con diferentes cepas de *Legionella*, antígeno no purificado de *L. pneumophila* sg. 1 o de *Escherichia coli*. Los sueros obtenidos en ratones mostraron alta reactividad a las diferentes legionellas, pero fueron negativos con el resto de antígenos. En otro trabajo, Kim *et*

6. DISCUSIÓN

*al.*³⁷ detectaron el antígeno de PAL en orina de cobayas infectadas con diferentes serogrupos de *L. pneumophila* o diferentes legionellas, así como en muestras humanas de pacientes sanos y enfermos de *Legionella*. El resultado demostró que el antígeno de PAL se excreta en la orina y que el análisis de este antígeno dio mejor rendimiento, para las mismas muestras, que otros test comerciales que usan otros marcadores no capaces de detectar otras especies de *Legionella* diferentes a *L. pneumophila* sg. 1, además de no mostrar falsos positivos. Parece ser por tanto PAL un marcador importante del género *Legionella*, ya que para diferentes especies su análisis produce resultados positivos mientras que para otros tipos de bacterias (*E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, etc.³⁷) el resultado es negativo, indicando así especificidad de género y la ausencia de reactividad cruzada. La producción de un antígeno recombinante de LPPA en el laboratorio¹³⁵ permitió la obtención de Mab específicos para epítomos del mismo, que una vez purificados se han analizado y han posibilitado la investigación y desarrollo de una línea específica para la detección del género *Legionella*, como se ha descrito en este trabajo, mostrando alta especificidad y elevada sensibilidad.

El **lipopolisacárido (LPS)** es un constituyente mayoritario de la pared celular de las membranas de las bacterias Gram-negativas^{44, 45}. Sus propiedades se relacionan con la especificidad de serogrupo de *L. pneumophila*^{42, 51-53}. Se compone de tres regiones estructuralmente distintas: el lípido-A, el núcleo de polisacárido y la cadena O-antigénica⁴⁶. Parece ser que la especificidad de serogrupo reside de hecho en esta región O-antigénica. Conlan y Ashworth⁵⁴ examinaron los antígenos relacionados con el serogrupo de una cepa de *L. pneumophila* sg. 3 virulenta y de cuatro cepas de *L. pneumophila* sg. 1 con diferente virulencia, para determinar la conexión entre el antígeno relacionado con el serogrupo de *L. pneumophila* y el LPS, el alcance de la heterogeneidad a lo largo de la cadena O-antigénica de LPS y si la posesión de dicha cadena es un requisito previo para la virulencia. Para ello realizaron una extracción fenol/agua mediante la cual se obtuvo el antígeno de LPS en la fase fenólica y no en la acuosa, como es lo más común para otros microorganismos. Este hecho lo explicaron como una consecuencia del alto contenido en lípidos o a la presencia de azúcares en la cadena O-antigénica, ya que ésto provocaría un aumento de la hidrofobicidad del LPS. Estos antígenos extraídos se analizaron por SDS-Page y Western-blot, y demostraron que la especificidad de serogrupo de *L. pneumophila* es de hecho debida a la cadena O-antigénica de LPS. En otro trabajo, Nolte *et al.*⁴⁶ examinaron la heterogeneidad del LPS de *L. pneumophila* y la relación serológica entre los LPS de los diferentes serogrupos de *L. pneumophila*. El LPS fue preparado por digestión de la proteinasa-K de lisados celulares de diferentes subtipos de *L.*

pneumophila sg. 1, así como de diferentes serogrupos de *L. pneumophila*. Estos LPS se analizaron por Western-blot con antisueros de conejo obtenidos con LPS de serogrupos 1, 2, 4 y 6, y se observó que sólo reconocían al LPS de cadenas de serogrupo homólogo. De esta forma se demostró que el LPS de cada serogrupo de *L. pneumophila* era un agente determinante de la especificidad del mismo. Por tanto, este constituyente de la membrana de *Legionella* es útil para el diagnóstico del sg. 1 de *L. pneumophila*, lo que ha permitido desarrollar Mab específicos para la detección del mismo¹³⁵ y de ahí su utilidad en el test inmunocromatográfico que se describe en este trabajo.

Por otro lado, también se relaciona al LPS con la posibilidad de clasificación en serogrupos basada en la reactividad con monoclonales del Panel Internacional o del Panel de Dresden^{9, 51, 58, 82}. Hasta el momento en que se empezaron a desarrollar los paneles de Mab para su uso en el diagnóstico del serogrupo de *L. pneumophila*, éste se realizaba mayoritariamente mediante técnicas serológicas con antisueros mono o policlonales producidos para diversos serogrupos². Posteriormente se comenzaron a desarrollar los mencionados paneles, primero en 1986 el Panel Internacional⁹ que contenía siete Mab (ver figura 1.3.1.2.), y más tarde el Panel de Dresden que estaba conformado por 98 Mab^{51, 58}. Helbig *et al.*⁵¹ comprobaron que era posible la clasificación en serogrupos y subtipos de *L. pneumophila*, analizando dichas cepas con los Mab seleccionados en el Panel de Dresden que reconocían al LPS de *Legionella*, demostrando así de nuevo la utilidad de este componente antigénico en el diagnóstico, así como su importancia en la clasificación de la bacteria^{86, 154}.

En la mayoría de los aislados clínicos relacionados con brotes epidemiológicos se ha encontrado un epítipo para LPS que reacciona con los Mab 2 y Mab 3/1. El Mab 3/1 reconoce a un epítipo asociado con el grupo 8-O-acetil del ácido legionamínico. Este grupo, identificado como un componente básico del LPS de *L. pneumophila* sg. 1, interviene en la unión del Mab 3/1 al LPS de dicho serogrupo de *L. pneumophila* y no en otros serogrupos⁵⁹. El subtipo asociado al Mab 2 es el que causa la mayoría de los casos de LD¹⁵⁵. Helbig *et al.*⁵⁸ estudiaron como los diferentes serogrupos de *L. pneumophila* se podían dividir en subgrupos de Mab con aislados clínicos de casos CAP, TrA y nosocomiales. Las técnicas empleadas para la determinación de los serogrupos fueron el ELISA o la inmunofluorescencia, usando los Mab específicos de serogrupo del Panel de Dresden o policlonales específicos de serogrupo preparados. El esquema de Joly *et al.*⁹ fue el utilizado para realizar la determinación de serogrupo de Mab. En el mencionado trabajo de Helbig *et al.*⁵⁸, se explica

cómo pueden caracterizarse los diferentes subgrupos de *L. pneumophila* sg. 1 en función del patrón de reactividad. El Mab 1 del Panel de Dresden determina si es *L. pneumophila* sg. 1 o *L. pneumophila*. Si se trata del sg. 1 (positivas al Mab 1), el Mab 3/1 discrimina entre las legionellas que reaccionan con él y las que no. Las cepas Mab 3/1 positivas se denominan tipo Pontiac e incluyen los tipos Knoxville, Philadelphia, Benidorm y France/Allentown. Estos cuatro grupos de Mab representan el 67% de todos los aislados causantes de enfermedad y se caracterizan por portar el epítipo reconocido por el Mab 3/1 asociado a la virulencia⁸². Por su parte, las no reactivas al Mab 3/1 se denominan no Pontiac e incluyen el grupo OLDA, Oxford, Bellingham, Heysham y Camperdown (CHOOB)¹⁵⁴. Helbig *et al.*⁸⁶ además indicaban que la sensibilidad de las cepas de las infecciones causadas por el Mab 3/1 o el Mab 2 era elevada. Todo ello es interesante porque las CHOOB son más frecuentes en casos nosocomiales que en CAP o TrA^{156, 157}, por lo que además podría determinarse la posible fuente de la infección o ayudar a su localización más rápidamente. Los casos nosocomiales son menores respecto a los CAP o TrA¹⁵⁶, siendo el 80% de las cepas positivas al Mab 3/1 debidas a estas últimas^{2, 59}. Los aislados ambientales son mayoritariamente negativos con el Mab 3/1^{82, 157}, lo que indicaría que son predominantes las mismas especies que en los casos nosocomiales. En el trabajo aquí desarrollado, todas estas legionellas se han detectado como puede verse en la tabla 5.7.3., indicando su utilidad para muestras positivas al Mab 3/1 o negativas al mismo, y que además se podrían identificar legionellas en muestras tanto ambientales como clínicas. Frente a los ensayos para detección de *Legionella* en orina, en los que frecuentemente la sensibilidad disminuye para los casos nosocomiales¹⁵⁷, este test desarrollado aportaría una ventaja importante.

Por su parte, la **proteína mayoritaria de la membrana externa (MOMP)** está presente en todos los serogrupos de *L. pneumophila* y existe como un agregado estable unido por enlaces disulfuro asociado al peptidoglicano^{60, 61}. Este componente ha sido estudiado y se ha determinado que es un antígeno específico de especie, pudiendo utilizarse como un marcador para diagnóstico de la especie *pneumophila* de *Legionella*⁶⁴. Gosting *et al.*⁶⁷ describieron y caracterizaron un antígeno específico de especie. Para ello produjeron Mab con *L. pneumophila* serogrupos 1 a 6 que analizaron mediante la técnica de ELISA con placas sensibilizadas con *L. pneumophila* serogrupos 1 a 6 y *Pseudomonas aeruginosa* como control negativo. Uno de los Mab obtenidos se observó que era reactivo a todos los serogrupos de *L. pneumophila* estudiados y se denominó Mab LP3IIG2. Posteriormente, se realizó un estudio con un Western-blot y un análisis por inmunofluorescencia. En el Western-blot con diferentes

cepas de *L. pneumophila* serogrupos 1 a 8 y otras legionellas no pneumophilas así como microorganismos no *Legionella*, se observó que el Mab LP3IIG2 reconocía una banda de aproximadamente 29 kDa en todos los serogrupos de *L. pneumophila* analizados pero no en legionellas no pneumophilas, así como tampoco en microorganismos no *Legionella*. Se obtuvo el mismo tipo de resultado con el análisis por inmunofluorescencia no existiendo evidencia de reacción cruzada. Posteriormente, Nolte y Conlin⁶⁴ pusieron de manifiesto que la banda de entre 26 y 29 kDa obtenida por Gostin *et al.*⁶⁷ correspondía a MOMP, lo que determina la existencia de un antígeno común en la especie *pneumophila* que puede ser por tanto útil para el diagnóstico de la misma. Su uso en el test ha aportado especificidad a la línea de *L. pneumophila* 1-15 y ha permitido poder distinguir el sg. 1 del resto de serogrupos de *L. pneumophila*, lo que es una gran ventaja, teniendo en cuenta que esta diferenciación permite conocer si la enfermedad ocasionada por *Legionella* se debe al sg. 1 o no, ya que dicho sg. 1 es el causante de 70-80 % de las neumonías severas provocadas por la bacteria. El factor de la diferenciación entre género *Legionella*, sg. 1 y serogrupos 2 a 15 de *L. pneumophila* puede ayudar también al correcto tratamiento del enfermo, ya que en algunos casos el agente causante de la infección no es correctamente detectado, debido a que los test disponibles en el mercado se dirigen mayoritariamente al diagnóstico del sg. 1^{37, 156}.

6.2. De los Métodos de Detección de *Legionella*

Entre los métodos de detección de *Legionella*, el aislamiento por **cultivo** sigue siendo el usado como referencia con una especificidad del 100 %¹⁹. Los ensayos para confirmación del cultivo pueden ser de diversa naturaleza, pero para su elección y uso es interesante la rapidez, fiabilidad y facilidad de ejecución de los mismos. El cultivo de *Legionella* puede ser difícil, ya que el medio necesita de suplementos específicos para su crecimiento y un personal experimentado para evitar falsos negativos. No obstante, al ser el método más específico es el más fiable para su aislamiento, ya que proporciona una ventaja significativa cuando la prevalencia de la enfermedad en la población es baja²³. Por otro lado, el aislamiento de la colonia permite tenerla disponible posteriormente para otros análisis en estudios epidemiológicos⁸. En muchos países el cultivo es obligatorio, por lo que son necesarios estos test de confirmación para muestras de cultivo.

De los diferentes métodos de confirmación o detección existentes, se ha evolucionado de los clásicos como la **serología, los métodos directos o los análisis bioquímicos** a la

6. DISCUSIÓN

detección por otros sistemas más modernos como son la antigenuria, las técnicas basadas en ácidos nucleicos o la inmunocromatografía. Los sistemas directos o serológicos necesitan de muestras en diferentes momentos de la enfermedad lo que limita su rápida detección², ya pueden producirse reacciones cruzadas y están restringidos a unas pocas especies frecuentemente aisladas^{22, 36}. La inmunofluorescencia es difícil de interpretar y posee una sensibilidad variable^{2, 81}, como el cultivo, y necesita de mezclas de reactivos para detectar las inmunoglobulinas G, M y A, aunque normalmente los kits comerciales se dirigen mayoritariamente hacia la detección de IgG². Los análisis bioquímicos son útiles para la clasificación de un microorganismo encontrado dentro de la familia *Legionellaceae* o el género *Legionella*³⁴, o incluso al nivel de especie³⁵, pero son complicados y requieren un alto coste de tiempo e instrumentación. Se usan mayoritariamente cuando aparece un nuevo organismo no identificado, como se muestra en los trabajos de Morris *et al.*⁸⁸, Helbig *et al.*¹⁵⁸, Park *et al.*⁵ o Tang *et al.*³⁵, donde se analizan el contenido en ácidos grasos, ésteres, quinonas y otros compuestos químicos relevantes por técnicas de cromatografía o espectrometría de masas, obteniendo datos para la clasificación de los microorganismos encontrados. Esta metodología tiene un objetivo más concreto y se aplica por tanto en los casos comentados, por lo que no es un método de rutina en el laboratorio.

El **análisis de ácidos nucleicos** ha avanzado también en los últimos años, encontrándose que esta técnica es aplicable tanto a muestras ambientales como clínicas. Pero en el campo de la detección de *Legionella* la metodología no ha alcanzado las expectativas esperadas¹⁹. Sin embargo ha mejorado con el desarrollo de la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el género o la especie de *Legionella* mediante el ARN y ADN ribosómicos y diversos genes que codifican la región heat-shock (dnaf), la región de la ARNpolimerasa (*rpoB*) o el gen *mip*^{2, 22, 159}. La sensibilidad de la técnica es moderada² y la especificidad es elevada^{81, 89}, y puede usarse en diversos tipos de muestras humanas como lavados bronquioalveolares, orina y suero². En el caso de muestras ambientales posee la limitación de no distinguir entre organismos viables y no viables^{74, 156}, lo que frente al cultivo es una desventaja importante, ya que en este sólo pueden crecer organismos vivos, que son los causantes de la enfermedad. Gutiérrez-Molina *et al.*¹³ estudiaron un brote de *Legionella* acaecido en la ciudad de Murcia en el año 2001, el cuál ha sido el de mayor importancia ocurrido en España. En el estudio se utilizó PCR y cultivo, entre otras técnicas, para el análisis de las muestras y se encontró que la PCR frente al cultivo tenía muy baja sensibilidad para la identificación preliminar y rápida de las posibles fuentes emisoras, lo que limitaba su

utilidad. Otra limitación de la técnica es que requiere una costosa instrumentación y operadores experimentados para su ejecución. La contaminación de las muestras o la presencia de inhibidores en las mismas son otros inconvenientes que presenta su realización¹⁹, y además, pueden surgir problemas asociados a la obtención de falsos positivos debido a la homología con otras bacterias^{2, 8}.

En la actualidad, la **antigenuria**, o detección de *Legionella* en orina, se ha extendido ampliamente porque permite el diagnóstico temprano de la bacteria en pacientes con un cuadro de neumonía. Los métodos enzimáticos para la detección en orina de *Legionella* tienen alta sensibilidad y especificidad, aunque esta última menor que el cultivo⁷⁹. En el caso de la inmunocromatografía para orina, también posee alta especificidad y sensibilidad^{10, 72}, pero normalmente necesita de la concentración previa de la muestra para obtener mejores resultados¹⁵⁶. Los test inmunocromatográficos para orina disponibles comercialmente tienen la gran limitación de que sólo detectan *L. pneumophila* sg. 1³⁷ (por ejemplo el producto Alere BinaxNOW® *Legionella* Urinary Antigen Card, <http://www.alere.com/ww/en/product-details/binaxnow-legionella.html>), por lo que la enfermedad causada por otra especie o género no queda diagnosticada. Por otro lado, el antígeno se excreta durante meses en la orina, por lo que un resultado positivo puede no ser indicativo de una infección aguda²³.

La **inmunocromatografía** se ha convertido en un método útil y eficaz para el diagnóstico de *Legionella*, pero como ya se ha comentado, los existentes para muestras de orina tienen la limitación de que sólo detectan el serogrupo 1 de *L. pneumophila*. A pesar de ello, es una técnica cómoda, rápida y de fácil ejecución², lo que invita al desarrollo de nuevos productos que puedan detectar el resto de especies o indicar la existencia de otros serogrupos.

6.3. De la Inmunocromatografía y el Oro Coloidal

La inmunocromatografía pertenece a las técnicas denominadas Test Rápidos o Lateral Flow (de flujo lateral). Son pruebas económicas debido a que no necesitan maquinaria adicional para su ejecución e interpretación, y existen muy diversas aplicaciones como drogas, embarazo o enfermedades infecciosas. Las configuraciones más frecuentes son las de tipo sándwich o de inhibición competitiva. Se pueden detectar anticuerpos si las muestras son sueros o plasmas, o antígenos si se usan para su análisis anticuerpos específicos^{101, 160}.

6. DISCUSIÓN

De los múltiples componentes que conforman una inmunocromatografía, el principal puede considerarse la **membrana**, ya que la elección de una apropiada es esencial para el éxito de un test rápido¹⁰¹. Sobre ella se inmovilizan las Mab que posteriormente reaccionarán con los posibles antígenos (Ag) de *Legionella* (PAL o LPPA, LPS-1 y MOMP) presentes en las muestras. En la elección de la membrana los factores a tener en cuenta son: la capacidad de unión de proteína, la porosidad (tamaño y distribución) y la fuerza de tensión^{101, 102, 105, 108}. La *capacidad de unión a la membrana* depende de su grosor y *porosidad*, siendo mayor a menor dimensión de poro. De los tamaños más comunes de poro, 0.1, 3, 5, 8 y 10 micrómetros^{101, 105}, para 8 y 10 micrómetros el flujo es más rápido. A mayor tamaño se produce un descenso en la sensibilidad¹⁰², por lo que si no hay una mejora del test significativa respecto a otros tamaños ampliamente usados como 5 micrómetros o no hay requerimientos de tiempo mínimo, no son aconsejables. En el caso de 2 y 3 micrómetros el flujo es más lento, por lo que debido a que fue innecesario el aumento de la sensibilidad, se descartó su uso para evitar también el posible incremento de la señal inespecífica en este test.

Las membranas pueden estar compuestas de diferentes materiales, de los cuáles son usados más comúnmente la nitrocelulosa (NC), el fluoruro de polivinilideno (PVDF), el nylon o el acetato de celulosa^{105, 161}. La vía de unión de las proteínas a la membrana varía en función del material, siendo para la nitrocelulosa o el nylon de tipo electrostático, hidrofóbicas para el PVDF o hidrofílicas para el acetato de celulosa¹⁰¹. La capacidad de unión de proteínas en el nylon es mayor que en la NC pero el flujo en ésta es mejor¹⁰⁵. Se eligió para la realización de este test la membrana de NC por sus características y propiedades de pegado y por su gran superficie interna, lo que favorece la adsorción de proteínas, así como por las experiencias previas de nuestro laboratorio. La membrana de NC se une a los Mab a través de interacciones electrostáticas producidas entre el fuerte dipolo del nitrato de celulosa y el fuerte dipolo del péptido (ver figura 3.1.1.1.) y no necesita de un tratamiento previo para ello^{101, 106, 162}. La capacidad de unión de una IgG está en torno a los 50-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ^{101, 162}, por lo que es suficiente para la adsorción de los Mab utilizados. La máxima concentración de Mab dosificado individualmente ha sido 1 mg/ml. Teniendo en cuenta que la razón de dosificación ha sido 0.6 $\mu\text{l}/\text{cm}$, como recomienda la bibliografía¹⁰⁵, y que la línea puede tener entre 1 y 2 mm y el strip un ancho de 3.8 mm (para el casete usado), la cantidad total de Mab unida fue en torno a los 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

La correcta orientación de la molécula es esencial para el funcionamiento adecuado del test, pero como Mansfield¹⁶² comenta, es un factor incontrolable y aleatorio, aunque gran parte de las moléculas lo hacen apropiadamente como es el caso de la mayoría de los anticuerpos. El medio que acompañe a la proteína o molécula a dispensar es importante y debe poseer baja cantidad de sales y aditivos que eviten la mala adsorción de la misma y no permitan su correcta orientación en la membrana¹⁰⁷. Cuando el agua se evapora en el proceso de secado y estos aditivos se concentran alrededor de la proteína, merman la habilidad de ésta para capturar el agente biológico para el que está destinado. Es deseable también evitar surfactantes y detergentes, ya que estos pueden impedir que la molécula entre en contacto con la NC a nivel molecular sobre todo a concentraciones elevadas^{101, 161}. En el test aquí desarrollado se ha evitado el empleo de gran cantidad de sales en la mezcla de anticuerpos dispensados, usando únicamente citrato 0.1 M al pH recomendado para cada Mab, acompañado de metanol^{108, 163} como coprecipitante, añadido en el momento de la dispensación, para favorecer el pegado con la orientación deseada. Jones¹⁰⁸ explica que la adición de los agentes coprecipitantes tiene la misión de reducir la estabilidad del Mab en disolución. La región F_c tiende a degradarse más con estos compuestos y expone mayor número de grupos hidrofóbicos, lo que favorece la unión a la membrana por esta zona frente a la F_{ab} y de ahí que los anticuerpos se orienten de la forma deseada.

El equipo de dispensación es importante también a la hora de inmovilizar el Mab en la NC^{109, 162}. Para el test se utilizó una dispensadora automática (Biodot ZX 1000, ver figura 4.1.5.4.) que difunde por capilaridad la línea que dibuja a una razón constante de dosificación. Del contacto del cabezal de dispensación con la membrana dependerá igualmente el ancho de la línea, por lo que debe evitarse que el contacto sea muy severo y se raye, así como el uso de un medio con alta molaridad¹⁰⁸, ya que se produciría un resultado erróneo con una línea muy fina y acumulación de los reactivos (oro, agente desarrollador del test, etc.) en el surco creado^{105, 162}. Las membranas de nitrocelulosa están pretratadas con detergentes y surfactantes que permiten un fácil mojado durante la dispensación de las proteínas^{101, 106}. En este caso, la dosificación no presentó ningún tipo de limitación, quedando una línea uniforme y de ancho apropiado (~1 mm). Esto ha permitido una lectura fácil de las líneas así como un llenado completo de las mismas cuando el conjugado ha reaccionado con ellas, no quedando huecos o bordes más intensos, como se espera de un test inmunocromatográfico^{108, 162, 164}.

6. DISCUSIÓN

En cuanto a la *fuerza de tensión*, la membrana es frágil por lo que fue necesario para su manejo la adición de un **backing o soporte** que le proporcionase la consistencia, cumpliendo con la necesidad de no interferir en el proceso ni química ni físicamente^{102, 109}. Para ello se laminó en tarjetas de poliestireno, lo que permitió su corte y le dio la rigidez necesaria para su uso, siendo totalmente inerte al proceso. Otros factores importantes han sido los **pads de absorción, muestra y conjugado**. Estos componentes son normalmente de fibra de vidrio, celulosa o poliéster^{109, 162} cuyas propiedades son baja capacidad de unión inespecífica y alta capacidad de absorción¹⁰¹. Finalmente se usó poliéster para la muestra y el pad de conjugado, por ser inerte a los reactivos químicos¹⁰² y permitir la liberación del flujo de pad a pad o a membrana cuando se rehidratan con la muestra¹⁰⁷. Una variación en la liberación del reactivo dosificado en el pad de conjugado puede introducir cambios en la sensibilidad¹⁶² debido a la salida mayor o menor de reactivo en cada caso. Para el pad de absorción se utilizó papel de 2 mm de grosor por tener la capacidad suficiente para recoger todo el volumen de la muestra. Todos estos componentes deben de elegirse de acuerdo a las propiedades que se desean para ellos^{162, 165}, pero una vez seleccionados han de ensamblarse en el strip con la configuración adecuada que permita que el flujo por capilaridad no se vea interrumpido, que la muestra avance y que sea recogido finalmente para que la reacción se vea completada en el tiempo^{101, 160}. Los pads se colocaron en el orden adecuado (ver figura 3.1.) y con el solapamiento estudiado que permitió mejor flujo y sensibilidad (ver apartado 4.2.3.11.). Carlberg¹⁶⁰ recomienda al menos un solapamiento de 1 mm sobre la membrana cuando sea posible porque mejora el flujo. En este test se probaron 1 y 2 mm de solapamiento del pad de conjugado sobre la membrana, pero 2 se adaptaba mejor al casete disponible. Por su parte, el pad de muestra se probó con 1 y 2 mm de solapamiento sobre el pad de conjugado y con diferentes tamaños, 1, 1.1, 2 y 2.1 cm, eligiéndose el solapamiento de 1 mm sobre el de conjugado. La incorrecta configuración de los pads podría provocar una diferencia en el flujo del test¹⁰¹, ya que un solapamiento erróneo de estos causaría una liberación inapropiada del conjugado, lo que inevitablemente conllevaría un descenso de la señal y de reproducibilidad entre ensayos. Por su parte el pad de absorción, de 2 mm de grosor, era capaz de retener los 90 µl de muestra y permitir que la membrana quedase sin restos de conjugado al término del tiempo, lo que permitía una clara lectura de las líneas.

Finalmente, los **casetes** plásticos son el último componente inmunocromatográfico a destacar. La configuración de los casetes es muy importante para el correcto desarrollo de la inmunocromatografía¹⁶⁰, ya que estos poseen barras de presión las cuáles actúan sobre el strip

que irá en su interior para mantenerlo en su posición¹⁰¹ y permitir que cada componente se encuentre en el sitio adecuado mientras se ejecuta el test. Para el test desarrollado se ha usado uno con la parte superior transparente que permite ver el flujo de los reactivos (ver figura 4.1.4.1.). Por su parte, el grosor del strip no interfirió con el casete, siendo apropiado para su uso¹⁶⁰.

Las membranas deben de almacenarse en condiciones de ausencia de luz y disolventes orgánicos¹⁰⁸ así como a temperatura y humedad controladas¹⁰¹. Por ello se han guardado los casetes individualmente en sobres de aluminio (opacos) con desecantes en su interior como se recomienda en la literatura¹⁰². Las tarjetas o pads dosificados se han almacenado en un armario desecante (ver figura 4.1.5.1.) donde se mantenían las condiciones apropiadas de conservación mencionadas.

El **oro coloidal**, como ya se ha explicado en el capítulo 3, es una suspensión de nanopartículas de oro de color rojo por lo general, que puede ser de diferentes tamaños y que permite la conjugación de proteínas en su superficie. Para la obtención de oro coloidal existen diversos métodos entre los que caben destacar algunos muy sofisticados, como la síntesis a partir de partículas sólidas en un medio acuoso por medio de fuerzas eléctricas¹⁶⁶, la reducción fotoquímica de soluciones de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4)^{120, 121} o electrodeposición por radiación¹²³, o más sencillos y rutinarios como la reducción de una solución de HAuCl_4 con citrato sódico, ácido ascórbico, ácido aspártico o borohidruro de sodio, entre otros^{111, 132, 167, 168}. En función del método llevado a cabo y de la cantidad de reductor puede obtenerse un tamaño deseado^{111, 112, 121}. Frens¹¹² preparó diferentes suspensiones de distintos tamaños de oro coloidal en función de la cantidad del reductor citrato sódico que se adicionaba a una disolución de HAuCl_4 . El método seguido por Frens consistió en el calentamiento hasta ebullición de las mezclas y la producción de soluciones que iban desde el naranja hasta el violeta, siendo éste último el de mayor tamaño y peor monodispersión. Esto muestra que el procedimiento sencillo de reducción química es una opción apropiada y económica de producción de soluciones de oro coloidal estables monodispersas de hasta al menos 70 nm. Otros métodos más costosos como el desarrollado por Sau *et al.*¹²¹ para la obtención de partículas entre 5 y 20 nm por radiación o el de van der Zande *et al.*¹²³ para la preparación de soluciones acuosas de oro con el fin de estudiar sus propiedades ópticas, requieren instrumentación compleja y costosa. En este trabajo el método seguido ha sido el desarrollado por Frens para la obtención de partículas de un tamaño de

6. DISCUSIÓN

entre 20 y 30 nm, lo que se ha conseguido sin dificultad. Para esto, el material utilizado se ha mantenido siempre limpio y destinado exclusivamente a este uso¹¹⁴, para evitar posibles impurezas que pudieran afectar a la nucleación de las partículas, como se comenta en los trabajos de Chaudhuri y Raychaudhuri¹²⁴ o de Geoghegan y Ackerman¹³¹. La nucleación incorrecta del oro coloidal puede provocar partículas no homogéneas, que producen una suspensión coloidal de baja calidad que no los hace aptos para su uso, debido a la formación de agregados informes (no esféricos) y de tamaños elevados cuyo color suele ser azul o violeta-negro, así como a la destrucción del potencial zeta que se forma en la partícula de oro y que hace que la suspensión coloidal sea estable por repulsión entre partículas¹¹³.

La validez del oro coloidal se ha determinado de acuerdo a los parámetros descritos en la bibliografía. Según Chaudhuri y Raychaudhuri¹²⁴ y Chun¹¹⁴, todas las suspensiones de oro coloidal proveen un único pico de absorción en el rango del visible entre 510 y 550 nm, encontrándose por tanto en este intervalo la denominada longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$). Mallick *et al.*¹²⁰ determinaron que esta $\lambda_{\text{máx}}$ se encuentra en torno a los 520 nm. Bozlee y Exarhos¹²⁵ mostraron que la absorbancia a 575 (A575) nm correspondía a una absorción típica de los coloides de metales debido a una resonancia en las proximidades de esta longitud de onda. La medida espectrofotométrica del oro coloidal debe producir una única curva indicando la forma esférica de las partículas coloidales¹⁶⁹, en la que los valores de A500 y A575 nm quedan a ambos lados del pico de absorción (ver figura 5.3.1.). La relación entre estas absorbancias puede proporcionar una idea de la abertura del mismo, lo que se relaciona con la monodispersión del coloide. Por ejemplo, si la curva es muy abierta y el valor de la relación entre A500 y A575 nm elevado, la solución sería más polidispersa. Tarozaité *et al.*¹²⁶, Norman *et al.*¹²⁷ y Rico-Moctezuma *et al.*¹²⁸, entre otros autores, describen que la formación de partículas de oro coloidal produce una absorción alrededor de A540 nm debido a la resonancia de los plasmones superficiales (una resonancia transversal y otra longitudinal cuyas absorbancias están centradas en aproximadamente 540 nm). Esta A540 nm aumenta hasta alcanzar un valor estable cuando la reacción se ha completado¹²⁸. La A540 nm es el valor que se toma como concentración del oro y posteriormente de los conjugados.

La obtención de un oro coloidal perfecto y estable es esencial para la **conjugación de proteínas**. Hermanson¹³² explica cómo se produce el fenómeno de la adsorción de proteínas en la superficie de la partícula de oro, enfatizando el hecho de que la partícula debe quedar rodeada de la cantidad necesaria para evitar que queden libres cargas negativas y puedan

provocar la coagulación de la suspensión con la adición de electrolitos a la suspensión (como NaCl)¹¹⁴. Esto quiere decir que la cantidad de proteína ha de ser al menos la mínima necesaria, primero para proteger a la partícula de oro frente a otras sales que puedan adicionarse posteriormente y también para mantener la solución conjugada en perfecto estado. Es la denominada MPC (mínima concentración que protege al oro), tal y como se comentó en el capítulo 3. Geoghegan¹²⁹, Geoghegan y Ackerman¹³¹ o Chun¹¹⁴, explican como la adsorción de las proteínas a las partículas coloidales depende del pH a la que se realice, por lo que ésta se estudia a diferentes valores. Para el caso de una IgG de conejo, estudiaron distintas cantidades de proteína para estabilizar el oro, varios pH de adsorción en función de la cantidad de IgG de conejo y el punto isoeléctrico de la misma. La medida de la absorbancia, una vez la proteína adsorbida en el oro coloidal, se realiza a 580 nm, observándose una caída en la misma cuando las partículas de oro se estabilizan con la adición de la proteína¹³². La concentración de proteína se representa frente a la A580 obtenida para cada medida (ver figura 3.2.3.1.), de modo que los valores de la parte inicial de la curva son los que no estabilizan al oro y los finales, que forman un plateau, los que si lo hacen.

Una vez determinada la MPC, el paso de la conjugación de proteínas al oro dependerá de los parámetros determinados, pero también de las condiciones posteriores en el proceso de pegado. Cuando la proteína se adsorbe a la partícula de oro, ésta no debe inestabilizarse, por lo que han de añadirse sustancias que actúen de agentes bloqueantes y lo eviten. Chadler *et al.*¹¹³, Horisberger¹³⁰, Geoghegan¹²⁹, Robinson¹²², Norman¹²⁷ o Jones¹⁰⁸, entre otros muchos autores, recomiendan la adición de gelatina, caseína, albúmina de suero bovino, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, o polivinil alcohol, entre otras sustancias, para la estabilización de los conjugados preparados. En el test desarrollado se ha usado un tampón de bloqueo de conjugación con albúmina de suero bovino, siguiendo las recomendaciones de la literatura¹¹⁴, a una concentración de 5 mg/ml. Con este bloqueo no se ha observado reacción inespecífica de los conjugados de Mab y se han mantenido estables en el proceso de preparación de los mismos así como posteriormente a 4 °C.

La conjugación depende, entre otros factores, de la carga superficial de las sustancias a conjugar. Hermanson¹³² explica cómo los anticuerpos se adsorben fuertemente al oro coloidal por la región F_c de los mismos, dejando la F_{ab} libre para la unión al Ag, así como que el pH óptimo de unión de la gran mayoría de los anticuerpos se encuentra entre 8 y 9. Robinson¹²² explicó la necesidad de que las partículas a conjugar tengan suficientes residuos de lisina,

triptófano o cisteína. Chandler *et al.*¹¹³ explicaron los posibles mecanismos de unión del anticuerpo al oro coloidal, como por ejemplo la atracción inicial de cargas del aminoácido lisina con carga positiva, hacia el oro que posee carga negativa. Otro mecanismo posible es la interacción hidrofóbica a través de ciertos aminoácidos como el triptófano y la unión por enlace dativo entre residuos sulfuro (provenientes del aminoácido cisteína) y la partícula de oro coloidal. Para una correcta conjugación, la composición en los aminoácidos anteriormente mencionados es muy importante, como Robinson¹²² comentó en su trabajo, sobre todo en moléculas de pequeño tamaño, ya que un número elevado de ellos puede afianzar dicha unión. Por último, Christopher *et al.*¹⁶⁷, pusieron de manifiesto la importancia de la localización de estos aminoácidos en la región F_c, ya que si se encontrasen en la F_{ab} del anticuerpo, la unión con éste se vería disminuida debido a un impedimento.

6.4. De los Resultados

6.4.1. De las Placas Inoculadas

Las cepas de *Legionella* que se inocularon para este estudio se hicieron con un agar específico para su crecimiento, ya que la bacteria requiere una serie de sustancias que otros medios no poseen, como L-cisteína, antibióticos o proteínas como la albúmina de suero bovina (BSA)^{2, 4, 22}. Se denomina agar BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract o Extracto Tamponado de Levadura y Carbón) con α -cetoglutarato, el cuál tiene la función de estimular la producción de enzimas bacterianas reductoras de oxígeno⁸. El color negro del medio se debe al carbón activo y la levadura es un reservorio de aminoácidos cuyo objeto es ser la fuente de energía que *Legionella* necesita para crecer^{2, 8}. Este medio es adecuado para especímenes de origen no estéril, ya que los aditivos que posee inhiben el crecimiento de otras bacterias²³. El cultivo es el método más sensible dado que crecen tanto legionellas causantes de la enfermedad como no¹⁹, y es válido para muestras de origen ambiental y clínico⁴.

Dado que las placas de agar-sangre no poseen los requerimientos que demandan para su crecimiento, las cepas de *Legionella* no se desarrollan en este medio. Por esta razón, las muestras ambientales se trabajaron tanto en agar-sangre como en agar *Legionella*, ya que se podía controlar en paralelo su crecimiento. Las colonias que al ser analizadas por el test desarrollado dieron positivas de *Legionella*, no crecieron en las placas de agar-sangre, lo que confirmó el resultado de identificación de las mismas.

6.4.2. De los Anticuerpos Monoclonales

El objeto del test ha sido desarrollar un método de detección de cultivos de *Legionella* basándose en anticuerpos específicos dirigidos a diferentes zonas de la membrana, las cuáles presentaban diferentes especificidades de género, serogrupo o especie. Para obtener un mejor resultado se han usado **anticuerpos monoclonales** (Mab), que proporcionan mayor especificidad que los policlonales⁸⁰. El proceso de obtención de Mab es largo, laborioso y complejo, pero una vez obtenido el clon productor de anticuerpo, este puede multiplicarse ilimitadamente y posteriormente ser purificado⁷¹. El proceso de preparación de los Mab se ha basado en la técnica desarrollada por Köhler y Milstein en 1975¹⁷⁰, los cuáles descubrieron que era posible la obtención de células híbridas a partir de la fusión de esplenocitos (linfocitos B) del bazo con células mielomatosas (tumor de las células plasmáticas productoras de anticuerpos). Demostraron que las células híbridas obtenidas eran inmortales y que de los híbridos se podían seleccionar los que producían el anticuerpo de interés. Ésta metodología es hoy ampliamente conocida y puede llevarse a cabo en laboratorios preparados para ello. En el departamento de Inmunología de Vircell, S.L. se obtuvieron diferentes clones productores de hibridomas con actividad específica a los antígenos de LPPA o PAL y el de LPS-1 de *Legionella*¹³⁵. Estos hibridomas se han usado para el desarrollo del test inmunocromatográfico que aquí se describe (ver ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS).

Los Mab específicos para género se obtuvieron a partir de la inoculación en ratones con antígeno recombinante de LPPA, mientras que los de sg. 1 se *L. pneumophila* se hicieron con LPS-1 (LPS de sg. 1 de *L. pneumophila*). De estas inmunizaciones, finalmente se consiguieron 6 para LPPA y 9 para LPS-1 y, tras la determinación de la actividad por ELISA, se dispuso para el test que se pretendía desarrollar de 4 de LPPA (B, C, D y E) y 5 para LPS-1 (A, E, F, H e I). En función de la subclase de la inmunoglobulina al que pertenecía cada uno se realizó la **purificación del anticuerpo por cromatografía líquida de alta resolución** (HPLC)¹⁷¹ con una columna de proteína A, ya que esta permite el uso de grandes volúmenes y Mab altamente purificados¹⁷². Las inmunoglobulinas se unen a la proteína A por su región F_c y se eluyen con variaciones de pH¹⁶⁷. Cada inmunoglobulina puede unirse a la columna a un pH diferente o necesitar de la presencia en distinta medida de sales que aumenten la conductividad, como la IgG₁, que requiere un pH 8.9, NaCl 3M y glicina 1.5 M, ya que la proteína A tiene poca afinidad por ella y esto favorece su unión¹⁷². El resto de inmunoglobulinas pueden añadirse a la columna de purificación a menor pH¹⁷³. Para la

6. DISCUSIÓN

elución de cada tipo de IgG es necesario un determinado pH, y el tampón citrato 0.1 M, al pH adecuado, es un medio apropiado, siendo de media en el caso de IgG obtenidas en ratón pH 6.5 (5.5 a 7.5) para IgG₁, pH 4.5 (4.5 a 5.5) para IgG_{2a} y pH 3 para IgG_{2b} (3.5 a 4.5) e IgG₃ (4 a 7). A continuación hay que neutralizar cada elución, con el fin de preservar su actividad¹⁷²⁻¹⁷⁴, lo que en este trabajo se realizó con TRIS 1 M⁸⁰. Aunque la producción de Mab proporciona un único anticuerpo, en el proceso de purificación con columnas con proteína A, otros materiales, como suplementos del medio o proteínas presentes provenientes de la fase de fusión, pueden quedarse retenidos en la columna, lo que en un proceso de elución a un único pH, puede provocar que el anticuerpo purificado se contamine. Debido a esto se recomienda una elución por gradiente, sobre todo si la IgG tiene poca afinidad por la proteína A¹⁷⁴.

En el proceso llevado a cabo en el laboratorio para los Mab con isotipo IgG₁ (ver figura 5.2.2.1. Tipo IgG₁) se optó por una purificación con gradiente de pH 6→5→4, hallándose posteriormente que la actividad se encontraba en un solo pico (resultados no mostrados). El resto de inmunoglobulinas (ver figura 5.2.2.1. Tipos IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃) se hicieron en un solo paso, eluyendo a pH 4 para IgG_{2a} y a pH 3 para IgG_{2b} e IgG₃. En el caso de los Mab de LPN (IgG_{2a}) y LPS1 I (IgG₃) se eligieron dos fracciones en función de la forma del pico cromatográfico con las eluciones más concentradas y otro con las menos (ver tablas 5.2.2.1. y 5.2.4.1.) debido a la necesidad de tener dos fracciones (para línea y conjugado), destinando para línea la de mayor concentración. En el resto de Mab se hizo una única fracción para su valoración. Los medios de elución fueron por tanto apropiados, ya que en la mayoría de los casos se encontró actividad en el purificado obtenido. Por este motivo se realizó posteriormente una prueba de evaluación de actividad por ELISA con placas sensibilizadas con el Ag para el que se dirigen dichos Mab, eliminándose los que no presentaron actividad (ver tabla 5.2.3.1.). El criterio usado de mantener el título a 0.1 y 1 µg/ml es puramente experimental, fruto de los resultados obtenidos en el laboratorio con anteriores proteínas. Si esta actividad no se mantiene en ambas concentraciones, se ha comprobado que la funcionalidad de las proteínas no proporcionaba la calidad requerida para diversos ensayos inmunológicos.

La **medida de la A280** se realiza porque es un indicativo del contenido de aminoácidos aromáticos en la proteína, y por tanto una manera de cuantificarla^{175, 176}. Los cálculos realizados son los que se muestran en el apartado 4.2.3.1.3. de la sección Métodos. Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 5.2.2.1. En cuanto a la determinación de la

agregación, la A320 puede considerarse una medida de la misma^{177, 178}. Para poder expresarlo en porcentaje, la medida de A320 se divide por la A280 y se multiplica por 100.

6.4.3. De la Preparación de Oro Coloidal y la Conjugación de Monoclonales

En el punto 6.3. se han expuesto los parámetros y los estándares que debe cumplir una solución de oro coloidal para ser considerada de calidad. En el oro preparado para la realización de los experimentos (ver figura 5.3.1., y tablas 5.3.1. y 5.3.2.), la $\lambda_{\text{máx}}$ está en 520 nm lo que, de acuerdo a los resultados experimentales de Mallick *et al.*¹²⁰ y Chaudhuri y Raychaudhuri¹²⁴, estaría dentro de los valores apropiados. En cuanto a la relación **A575/A500**, es de 0.453, lo que indica que el oro es monodisperso, ya que un valor cercano a 1, muestra más polidispersión al ser un pico mucho más ancho. La **A540** es la densidad óptica (OD) que se toma como valor de concentración del oro y es la base de la OD de los conjugados que posteriormente se prepararán con él.

Con este oro coloidal preparado y los Mab obtenidos se han realizado las diferentes MPC a pH 9 como punto de partida (ver tabla 5.4.1. A y figura 5.4.1. A). Geoghegan¹²⁹ explica como el pH de pegado al oro para las IgG a valores ácidos provoca una pobre adsorción, mientras que a valores alcalinos en torno a 10 mejora considerablemente, determinando que el rango apropiado es entre 7 y 10, mientras que Hermanson¹³² indica que el mejor pH de adsorción para anticuerpos es 8 ó 9. Al realizar el estudio de pegado de los Mab al oro coloidal, pH 9 ha sido ideal en casi todos los casos. En las ocasiones en que así no fue (ver tabla 5.4.1. B y figura 5.4.1. B), se evaluaron puntos concretos a pH 5 y 7. En los datos obtenidos se observa como la curva no cae debido a la no estabilización del oro coloidal (figura 5.4.1. B), encontrándose que a pH 5 y pH 7 los valores no se modifican, por lo que se consideró que estos Mab no estabilizaban adecuadamente al oro. Aún así, se decidió preparar los conjugados con estos Mab para su valoración (ver tabla 5.5.1.), tomando como MPC un valor estándar de 6 $\mu\text{g/ml}$ a pH 9 como el resto de Mab. De estos conjugados sólo pudo terminarse el de LPS-1 F, ya que para LPS-1 A y LPS-1 E la coagulación fue irreversible. Para LPS-1 F el conjugado fue muy polidisperso ($A575/A500 > 1$). La mala unión podría deberse a un bajo contenido en los aminoácidos esenciales para la conjugación^{113, 122, 168}, o a una incapacidad de soportar y estabilizar la doble capa negativa del oro coloidal, provocando que éste coagule. La MPC para los Mab que pudieron unirse al oro se tomó en general como

el segundo valor de estabilización de la curva (ver tabla 5.4.1. A), es decir, cuando la absorbancia se hizo constante, para asegurar la estabilización del oro coloidal.

6.4.4. De la Determinación del Sistema Óptimo

6.4.4.1. De la Funcionalidad de los Monoclonales

El primer punto a estudiar para todas las líneas que se querían preparar fue **valorar la funcionalidad** de los Mab en la membrana y el conjugado, realizándose para ello un ensayo de cribado que pretendía determinar la reactividad entre ellos.

Se eligió para la línea género (GÉN) el Mab LPPA E en membrana porque fue el que mostró mejor actividad con el resto de Mab en el conjugado (ver tabla 5.6.1.1. y 5.6.1.2).

Para el caso de la línea con Mab de LPS-1 (SR1), como sólo se disponía de conjugados de LPS-1 F y H, se valoraron éstos frente al resto de Mab en membrana (ver tabla 5.6.2.1. A y B). Se obtuvo como resultado que LPS-1 H en línea no funcionaba, mientras que si lo hacía en el conjugado. Por su parte, el conjugado de LPS-1 F era muy inespecífico, probablemente debido a su polidispersidad originada por una mala estabilización coloidal, como demostró su MPC. Esto condujo a la elección de LPS-1 H para el conjugado y el resto de Mab de LPS-1 para la línea.

En cuanto al Mab de la línea de especie (ESP), éste mostró que tanto en conjugado como en línea funcionaba (ver tabla 5.6.6.1.), pudiéndose así preparar una línea de ESP específica que permitía por tanto diferenciar el sg. 1 de los serogrupos 2 a 15 en muestras de *L. pneumophila*.

6.4.4.2. De la rotura de la Membrana

Tras la determinación de la composición inicial de los sistemas involucrados en el test, se procedió a la optimización de los mismos. Evidentemente fue necesario un ajuste de las condiciones de la concentración en línea y de la OD de los conjugados tomados como iniciales, así como la combinación de los mismos en membrana y conjugado para una óptima determinación de los antígenos de LPPA, LPS y MOMP de *Legionella*. En el punto 1.1.3. se comentaron las características de estos antígenos que se pretendía detectar. Recordando, PAL o LPPA es un componente soluble de la membrana^{37,38}, mientras que con el antígeno de LPS-

1 ocurre lo contrario, debido a su contenido en lípidos y en enlaces disulfuro^{44,50}. Por su parte MOMP requiere de detergentes y EDTA para ser expuesto en la membrana^{61,64}. La correcta exposición de dichos antígenos a los Mab conjugados al oro o inmovilizados en la membrana se convirtió en un punto esencial del desarrollo y optimización del test. Por esta razón se procedió al estudio de la rotura de la membrana de la bacteria por **métodos físicos y químicos**. Scopes¹⁷⁹ explica cómo pueden prepararse extractos de bacterias. Entre los **métodos físicos** más comunes para producir la rotura de la membrana se encuentran la sonicación, la prensa de French o el tratamiento con bolas de vidrio¹⁸⁰. La rotura física por sonicación se vio como un método viable para lograr el fraccionamiento de la membrana celular frente a los demás, debido a la menor manipulación de la muestra y a que el volumen de las mismas era reducido, ya que el test admitía una determinada cantidad de líquido (~90 µl). Se llevó a cabo la sonicación de las muestras de *Escherichia coli* y *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia con el objeto de romper la membrana y exponer mejor los antígenos que en ella se encuentran. Se estudió primero con la línea de GÉN (ver tabla 5.6.1.3.) y se observó que mejoraba un poco la señal, pero aumentaba la inespecificidad. Al ser un método que no puede utilizarse a gran escala por ser tedioso y complejo, así como la necesidad instrumental que su uso supone, se desestimó y se optó por una rotura química como mejor opción, puesto que esto permitiría menor manipulación a la hora de la realización del test en el futuro.

La rotura química se vio como una alternativa más fácil a la hora de introducirla en un procedimiento, pero suponía una tarea compleja debido a que los medios y reactivos tenían que cumplir la condición de ser estables en el tiempo y no alterar la funcionalidad y especificidad de las líneas en conjunto. Los **métodos químicos** incluyen la quelación de metales con EDTA o EGTA entre 1 y 10 mM, condiciones básicas con baja fuerza iónica, detergentes no iónicos, disolventes orgánicos parcialmente solubles en agua, altas fuerzas iónicas o tratamiento con fosfolipasas entre otros¹⁷⁹. Normalmente el método final puede consistir en la combinación de uno o varios de ellos. Se comenzó a estudiar la funcionalidad de diversos detergentes. Éstos se usan principalmente con proteínas porque permiten su solubilización. Neugebauer¹⁸¹ explica las diferentes propiedades de los mismos. El hecho de existir detergentes con distinta carga, hace que sea posible su uso para una gran variedad de propósitos. La estructura del mismo se ve afectada por el pH, la temperatura, la fuerza iónica o la presencia de impurezas, lo que por tanto, en función del medio, provocará que tenga un efecto concreto. Esto indicaba que el medio era importante para el correcto funcionamiento del detergente en la disolución. Los no iónicos pueden inducir la lisis celular pero son los que

6. DISCUSIÓN

mejor mantienen estables las soluciones, mientras que los iónicos son más agresivos y en ocasiones muy desnaturalizantes¹⁷⁹, por lo que era esencial la elección de uno que no destruyese la proteína y los antígenos de la membrana de forma irreversible. Por todo ello se estudió una batería de tipos de detergentes y también se probó otro desnaturalizante común, β -mercaptoetanol, para comprobar si la rotura de la membrana podía realizarse sin tratamiento con detergentes.

Como puede verse en la tabla 5.6.1.4., diversos **detergentes** al 1% (p/v o v/v) se compararon para GÉN frente a la condición no tratada. Se comenzó a trabajar con la muestra a McFarland 1 (McF1)^{133, 134} (A600:0.25, $\sim 3 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml) para poder normalizar el sistema, y como tiempo de incubación se tomaron 10 minutos a temperatura ambiente. El resultado puso de manifiesto la acción que el detergente ejercía sobre la bacteria, ya que al añadirse el tratamiento a la muestra positiva, comenzó a verse algo más significativamente con Brij[®] (no iónico), emulfofen (no iónico), Tritón[®] X100 y X114 (no iónicos), sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propano (CHAPS) (zwiteriónico), ácido deoxicolato (AD) (aniónico) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (catiónico)¹⁸¹. Mayoritariamente, las mejores señales se obtuvieron con los no iónicos. El β -mercaptoetanol agregó las partículas de oro de la mezcla de conjugados, por lo que se descartó su uso. La combinación de algunos detergentes proporcionó una mejora (ver tabla 5.6.1.5.), que dejaba ver una mayor diferencia de intensidad entre la muestra negativa y la positiva. Una vez comenzado el estudio de la adición de detergentes, se consideró mover otros factores que también son importantes en la desnaturalización de las proteínas. La temperatura, el pH o la fuerza iónica, como se ha comentado, fueron algunos de ellos. Se probaron diferentes **temperaturas**, ya que esta puede desestabilizar la estructura de la membrana¹⁸¹, combinándolas con la acción de la mezcla de detergentes sobre el sistema GÉN. El resultado obtenido mostró que un aumento de la temperatura de incubación con el detergente mejoraba el efecto del mismo y no hacía que la señal para *E. coli* fuese inespecífica, como puede verse en la tabla 5.6.1.6. Esto supuso un avance significativo en el sistema, puesto que la señal se hizo más visible. En el caso de SR1, la combinación de detergentes y el aumento de la temperatura de incubación proporcionó un aumento de la señal a 95°C (ver tabla 5.6.2.2.) respecto a temperatura ambiente (ver tabla 5.6.2.1.), mientras que los detergentes provocaron fondos con la muestra de *E. coli* como se observa en la tabla 5.6.2.2. El análisis de estos por separado reveló que la falsa señal positiva en la muestra negativa se debía a la combinación de los mismos (ver tabla 5.6.2.3.). Esto indicaba que lo que mejoraba a GÉN no lo hacía con

SR1 en estas condiciones, motivo por el cual con el sistema de Mab para cada línea bastante definido se comenzó el estudio en paralelo de ambas líneas. Manteniendo como base CTAB, que había ido mejor para GÉN, se realizaron de nuevo estudios de mezclas con AD, Brij[®], N-laurilsarcosina (NL) (aniónico), Nonidet P-40 (NP40) (no iónico), sodio dodecilsulfato (SDS) (aniónico) y Tween[®] 20 (T20) (no iónico), manteniendo la incubación con 95°C que mejoraba la señal. Sin embargo la mezcla en el medio de incubación con CTAB de estos detergentes producía fondos en una u otra línea en función del detergente (ver tabla 5.6.3.1.), aunque la mejor combinación fue con no iónicos. Esto propició que se estudiaran otras condiciones.

Manteniendo el CTAB y la incubación con temperatura se probó el uso del **antibiótico sulfato de polimixina-B** (PMB). Este antibiótico es fuertemente catiónico y produce la desestabilización de las membranas citoplasmáticas induciendo la formación de poros en las paredes celulares en bacterias Gram-negativas al unirse al lípido A del LPS¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Se pensó en su utilidad debido a que se habían obtenido resultados bastante positivos con un detergente catiónico y, por tanto, la posible acción sinérgica de ambos podía ser importante para el sistema. Por su parte PMB, al ser un antibiótico, serviría para inactivar a *Legionella* en la manipulación con muestras vivas, hecho que efectivamente ocurrió ya que tras la inclusión en las muestras éstas no volvían a crecer en agar *Legionella*. La adición de altas cantidades de PMB a la muestra negativa (*E. coli*) y a la positiva (*L. pneumophila* sg. 1) a McF1 provocaba un aumento de los falsos positivos en SR1 como puede verse en la tabla 5.6.3.2., pero la adición de la misma cantidad de PMB a las muestras con el detergente reducía esta señal inespecífica (ver tabla 5.6.3.4.) y además, mejoraba la respuesta para GÉN (ver tabla 5.6.3.3.).

Anteriormente se había estudiado para la línea de GÉN el uso de NaCl con el fin de aumentar la **fuerza iónica** del medio, así como el cambio del **pH**, con el objetivo de ver si la actividad mejoraba¹⁸¹. También se estudió la posibilidad de eliminar el developer que se añadía para que la muestra pudiese correr por la membrana, ya que éste poseía detergentes como T20 que, además de permitir fluir la reacción, puede ayudar a evitar reacciones inespecíficas¹⁶¹. De este estudio se concluyó que el medio a pH 7.2 era mejor para la sensibilidad que a pH 8, como se observa en la tabla 5.6.1.7., y que una concentración de NaCl 150 mM no afectaba a las señales y podría incluirse en el medio si fuese necesario aportarle fuerza iónica (ver tabla 5.6.2.4.). De hecho, como puede verse en la tabla 5.6.3.4., la señal de la línea GÉN y la línea SR1 mejoró al poner en el medio el detergente no iónico T20 y NaCl, así como el antibiótico PMB, por lo que el CTAB pudo descartarse por ofrecer peores

resultados. La combinación de NaCl, T20 y PMB produjo como resultado una señal equiparable en GÉN y SR1 con 5 y 10 μl de PMB (ver tabla 5.6.3.5. A) y la ausencia de falso positivo, aún incluso cuando la muestra era el doble de cantidad (McF2, $\sim 6 \times 10^8$ UFC/ml), como se puede ver en la tabla 5.6.3.5. B. Observando los resultados, se deduce que a mayor cantidad de PMB añadida al medio, más específico se hace el sistema, hasta lo que parece una saturación, ya que el cambio de 5 a 10 μl no lo altera, mientras que el paso de 1 a 2.5 o de 2.5 a 5 μl es acusado. El medio NaCl-T20-PMB (NTP) era bastante eficiente. Esto estaría de acuerdo con la hipótesis inicial del uso de una sustancia catiónica para la mejora del sistema y el hecho de que PMB se una al LPS^{148, 150}, ya que probablemente lo expone de manera más apropiada y esta acción, combinada con los detergentes que rompen la membrana, puede favorecer su reacción con los Mab del conjugado o de la línea.

6.4.4.3. De las Condiciones de Reacción

El aumento del **volumen de muestra** se estudió previamente para la línea GÉN (ver tabla 5.6.1.7.), tanto a TA como a 95°C, viéndose que éste correlacionaba con un incremento de la señal y que a 95°C era mayor que a TA. El uso de un developer estándar con detergentes, como ya se ha comentado, se debió a la necesidad de que la muestra pudiese fluir por la membrana de la tira, ya que debido a la hidrofobicidad de ésta, se ve favorecido el flujo con el uso de detergentes y surfactantes^{101, 163}. Al incluir T20 al medio, que era el mismo detergente que llevaba el developer utilizado, podía fluir por la membrana como lo había hecho hasta ahora. Además, se había demostrado su utilidad en la rotura de la membrana celular. El developer también llevaba sales en el medio, por lo que tamponar el diluyente de la muestra era una manera de eliminar definitivamente la solución desarrolladora, haciendo el test mucho más sencillo de ejecutar. Un volumen de 90 μl correspondía a 40 μl más dos gotas de developer, por lo que se adoptó este volumen para el test. Se probaron volúmenes superiores pero excedían la capacidad de retención del pad de muestra. El volumen necesario debe ser al menos el que permita redissolver los reactivos de los diferentes pads que se rehidratan con la muestra y luego sea capaz de fluir por la membrana¹⁸². En este caso, los 40 μl de muestra iniciales más 2 gotas de developer con T20 lo permitían, así como el cambio al medio con T20 y 90 μl totales. El resultado puede verse en la tabla 5.6.3.6. y muestra que efectivamente el developer podía eliminarse, ya que el resultado era equivalente a 40 μl más 2 gotas como se observa en la tabla 5.6.3.5. A. El volumen de muestra a añadir también se relaciona con la **configuración del strip y el solapamiento de los componentes inmunocromatográficos**. Si

estos, como ya se ha comentado anteriormente en el punto 6.3, no se colocan apropiadamente el flujo no será el adecuado^{101, 160} aunque se aumente la cantidad de muestra, ya que el problema se debería a un error en el montaje que impediría la evolución adecuada del frente de reacción y podría afectar a la sensibilidad.

La nueva cantidad de muestra y la incubación con calor eran factores que a priori mejoraban el sistema para ambas líneas. El **medio común** NTP proporcionó resultados favorables. La adición de más cantidad de PMB con 90 µl de muestra no pareció mejorar ya que en la línea GÉN aparecían fondos, como se observa en la tabla 5.6.3.7. El estudio entre la incubación a 5 minutos a TA y 10 minutos (5 minutos a TA + 5 minutos a 95°C) aseguró que un mayor tiempo mejoraba la señal (ver tabla 5.6.3.2.).

Con este nuevo medio común NTP se estudió el **tiempo de reacción y la procedencia de la muestra**. El tiempo estimado del test fueron 15 minutos, pero aumentarlo por ejemplo al doble mejoró la señal (ver tabla 5.6.3.8.), por lo que se tendría en cuenta si fuese necesario. El tiempo de reacción es un factor que dependerá del tamaño de poro de la membrana, de los detergentes y surfactantes que lleven los reactivos o de la propia configuración del casete¹⁰¹, por lo que es un parámetro que debe determinarse experimentalmente. Otro factor que se evaluó fue la procedencia de la colonia, en concreto bacterias procedentes de placas inoculadas, con el objetivo de comparar los resultados con los de muestras inactivadas por calor, como hasta ahora se habían usado los cultivos de *L. pneumophila* sg. 1 analizados en el diseño del test. Se realizó a diferentes tiempos de lectura y con distintas cantidades de muestra (1, 2 y 3 col/200 µl). El resultado puede verse en la tabla 5.6.3.9. El análisis de colonias vivas recogidas de una placa inoculada proporcionaba los mismos resultados que con las inactivadas por calor, lo que significaba que la rotura de la membrana de la bacteria con el medio NTP funcionaba con las colonias vivas y era eficaz, además de que la señal obtenida no se debía a una posible rotura o desestabilización de la membrana por el calentamiento. Esto permitió el análisis de gran cantidad de muestras y su almacenamiento para poder evaluarlas en el tiempo.

6.4.4.4. De la Evaluación Inicial del Test

Con las condiciones desarrolladas (medio común NTP para GÉN y SR1, incubación de la muestra con calor (95°C) y 15 minutos de desarrollo del test) se evaluaron muestras de *L. pneumophila* serogrupos 1 a 15 y *Legionella* no *pneumophila* procedentes de colecciones de

6. DISCUSIÓN

ATCC, NCTC y DSMZ (grupo I), así como muestras aisladas clínicamente (grupo III). Para la línea de SR1 todas las muestras salvo *L. pneumophila* sg. 1 debían ser negativas, mientras que para GÉN todas excepto los cultivos de muestras no *Legionella* tendrían que ser positivas. El resultado fue el que se puede observar en las tablas 5.6.3.10., 5.6.3.12. y 5.6.3.14. Las muestras de *Legionella* para GÉN eran positivas excepto para *L. bozemanii* sg. 1 y 2, y *L. gormanii* (ver tabla 5.6.3.14.) y negativas para muestras no *Legionella* pero con sombras, mientras que en SR1 había numerosas señales inespecíficas o sombras, como se observa en la tabla 5.6.3.10. Esto indicaba algún tipo de reacción no específica estaba interfiriendo en el sistema. Una metodología común en inmunocromatografía es el **bloqueo de pads de muestra**, ya que es una forma efectiva de evitar reacciones inespecíficas. De hecho es preferible el bloqueo del pad de muestra al de la membrana¹⁰¹, que aun siendo en muchos casos más efectivo, puede provocar la desorción de la línea de captura o un descenso en la capacidad de flujo de la membrana¹⁰⁸. Como explican Mansfield¹⁶², Butler¹⁶¹ o Jones¹⁶³, entre los medios de bloqueo más comunes se encuentran agentes tamponadores de la disolución, sales, surfactantes, polímeros o proteínas como BSA, caseína o suero de ternera. De ellos la caseína ha demostrado que es una de las más eficientes en sistemas de lateral-flow, debido a que las moléculas de pequeño peso molecular de la misma se introducen entre las grandes moléculas de los receptores de estos bloqueantes. El bloqueo del pad de muestra es relativamente fácil respecto a la membrana, y existe el problema de que a largo plazo, la proteína bloqueante pueda llegar a desplazar a la molécula de interés adsorbida en la membrana¹⁰¹. Por este motivo se decidió probar a bloquear el pad de muestra con caseína y NaCl para darle fuerza iónica, lo cual supuso una bajada drástica de los fondos de la reacción (ver tablas 5.6.3.11.) para SR1 y 5.6.3.13. para GÉN), introduciéndose así este elemento en la configuración del test.

6.4.4.5. De la Solución de Problemas en Línea Género y Serogrupo 1

Tras la evaluación inicial de las muestras, se observó que la línea GÉN no era capaz de reconocer a las cepas de colección *L. bozemanii* sg. 1 y 2 y a *L. gormanii*, mientras que la línea SR1 no detectaba al grupo no Pontiac: *L. pneumophila* sg. 1 Camperdown, *L. pneumophila* sg. 1 Heysham, *L. pneumophila* sg. 1 Oxford, *L. pneumophila* sg. 1 OLDA y *L. pneumophila* sg. 1 Bellingham (CHOOB), como se observa en la tabla 5.6.3.14.

Respecto a las **muestras problemáticas para GÉN**, Moon *et al.*³⁸ estudiaron la diversidad antigénica de PAL, obteniendo antígenos solubles de 16 especies de *Legionella* diferentes que analizaron con Mab obtenidos con antígeno de PAL recombinante clonado a partir de *L. pneumophila* sg. 1. Los resultados mostraron que no todos los Mab eran capaces de reconocer todas las cepas, ya que cada Mab seleccionado tenía un patrón distinto de reactividad, debido probablemente a la compleja naturaleza antigénica de PAL. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos, lo que hizo pensar en que quizás los Mab seleccionados no eran reactivos frente a los epítomos existentes. Para comprobar si esta hipótesis era cierta o no, se realizaron ensayos de Western-blot, de ELISA y de inmunofluorescencia. El resultado por Western-blot mostró que el Mab LPPA B no reconocía a dichas cepas, pero el resto de Mab de LPPA lo hacían en mayor o menor grado (ver figura 5.6.4.1.), luego los Mab del sistema combinados entre sí deberían ser capaces de reconocerlas, aunque no lo eran en el sistema inmunocromatográfico. Cascales *et al.*³² comentan que el antígeno de LPPA (o PAL) pertenece a un sistema de envoltura de la membrana denominado Tol-Pal, que se encarga de mantener la integridad de la misma³⁹. En dicho trabajo, el aislamiento de LPPA para su cuantificación in vivo e in vitro muestra que este antígeno forma dímeros. En el Western-blot llevado a cabo (ver figura 5.6.4.1.) puede comprobarse la existencia de una banda de aproximadamente el doble de tamaño de la de LPPA original de 19 kDa, pero que sólo es reconocible en *L. longbeacheae* sg. 1 y prácticamente nada en *L. bozemanii* sg. 1 y 2, ni en *L. gormanii*. Dicha banda es reconocida por los Mab de LPPA probados: B (en LLs1), C (en LBs2, LG y LLs1), D (en LLs1) y E (LBs1 y LBs2). Esto podría quizás indicar que estas legionellas problema no formarían este dímero o lo harían en menor proporción y quizás ello pueda ser uno de los motivos por el cual no son reconocibles como el resto, aunque es una hipótesis que hubiese necesitado un estudio más en profundidad en su momento. En el ensayo de ELISA todos los Mab dieron positivo con al menos algunas de las cepas analizadas, como se observa en la tabla 5.6.4.1., mientras que en el ensayo de inmunofluorescencia sólo el Mab de LPPA C dio con las cepas problemáticas, como puede verse en la tabla 5.6.4.2. Por tanto, el método inmunocromatográfico parecía que no era completamente eficiente.

Se procedió de nuevo al estudio de rotura por métodos físicos. Numerosos autores han publicado evaluaciones de rotura de membranas por tratamiento con bolas de vidrio con¹⁸³⁻¹⁸⁵ o sin éxito¹⁸⁶. En las cepas de *Legionella* problemáticas para la línea GÉN probadas, el resultado obtenido fue nuevamente la ausencia de señal, como puede verse en la tabla 5.6.4.3.

6. DISCUSIÓN

Mayor cantidad de bolas de vidrio (ver tabla 5.6.4.4.) o un protocolo con calor (ver tabla 5.6.4.5.), o con una agitación más agresiva o durante un mayor periodo de tiempo (ver tabla 5.6.4.6.), no mejoró los resultados, motivo por el cuál se siguió insistiendo en el método de rotura químico, que hasta el momento era el que mejor resultados había dado. Se probó de nuevo el detergente CTAB, que parecía haber mejorado la línea GÉN, pero se vio que a mayor cantidad del mismo la señal disminuía también en GÉN (ver tabla 5.6.4.7.), como lo había hecho en SR1 y por este motivo se descartó definitivamente. Se decidió estudiar entonces de nuevo el pH del medio, ya que anteriormente se había observado que la adición de NaCl y pH 7.2 habían favorecido la reacción (ver apartado 6.4.4.2. y tabla 5.6.1.7.). El pH de la mezcla de reactivos NTP era aproximadamente de 4.5, por lo que se preparó NTP con Borax 50 mM a pH 9 (BNTP) y NTP con fosfato 50 mM a pH 7.2 (FNTP) y se probó en paralelo a NTP. El resultado puede verse en la tabla 5.6.4.8., dónde se muestra que a pH 9 las muestras positivas incluso empeoraban mientras que a pH 7.2 eran similares. Con el medio tamponado se analizaron las legionellas que habían dado problema (tabla 5.6.4.9.) y éstas resultaron ser positivas. Según los procedimientos generales de preparación de anticuerpos, el pH ácido no les favorece⁸⁰, por lo que se neutralizan con TRIS 1 M. La reacción se estaba produciendo a este pH ácido (~4.5), lo que estaría provocando que estos Mab no estuvieran funcionales al cien por cien, ya que el cambio ocurrido al modificar el pH tamponando fue muy importante

En el caso de las **muestras problemáticas para SR1**, para saber si los Mab tenían la capacidad de reconocerlas, se prepararon unos porta-objetos para inmunofluorescencia sensibilizados con *E. coli* como control de *L. pneumophila* negativo y *L. pneumophila* sg. 1 Knoxville como control positivo, y el grupo no Pontiac CHOOB (cada una en un pocillo diferente). Se analizaron con los Mab de LPS-1 y se observó que con el Mab que iba en el conjugado, LPS-1 H, daban negativas (ver tabla 5.6.5.1.), por lo que aunque los Mab que se encontraban en la membrana si lo hubieran hecho, al no hacerlo el Mab del conjugado, el sistema daba por tanto negativo. El problema estaba en que los Mab de la membrana se encontraban ahí porque no se pudieron conjugar o eran inespecíficos una vez conjugados (ver tabla 5.6.2.1. y 5.6.5.2. y 5.6.5.3.). Fue necesario analizar otros Mab disponibles y que no se habían considerado ni crecido debido al número elevado de Mab inicialmente procesados. Se analizaron por inmunofluorescencia dos nuevos hibridomas: LPS-1 I y LPS-1 G. Se sensibilizaron porta-objetos con diferentes cepas positivas de *L. pneumophila* sg. 1 y negativas (*E. coli* y *P. mirabilis*), y se observó que el Mab de LPS-1 I si daba señal con las

cepas positivas, mientras que no lo hacía con las negativas, como se muestra en la tabla 5.6.5.4. En el caso de LPS-1 G no se obtuvo señal positiva para ningún pocillo de las legionellas problemáticas, descartándose su uso. Este Mab LPS-1 I se procesó como el resto y se evaluó en membrana y conjugado y, como puede observarse en la tabla 5.6.5.5., daba señal positiva con las muestras del grupo CHOOB, por lo que se tituló y ajustó para su uso tanto en membrana y conjugado ya que era necesario en ambos lados. Dado que cada Mab se une a una región concreta del antígeno y no a la molécula entera del mismo¹⁸⁷, el Mab LPS-1 H no debía de reconocer el epítipo o los epítipos existentes en LPS-1 necesarios y complementarios a los reconocidos por los Mab LPS-1 A, E y F que se encontraban en la línea. El Mab de LPS-1 I por tanto sí se unió a los epítipos necesarios para que la señal fuese positiva. Entre los diferentes isotipos de IgG pueden existir diferencias en la función efectora de los mismos^{147, 188-190}, por lo que al ser LPS-1 H del subtipo IgG_{2b} y los Mab LPS-1 A, E, F e I del subtipo IgG₃, podría estar indicando que éste último es más reactivo con LPS-1 que el IgG_{2b}. Una observación acerca del Mab de la ATCC que reconoce *L. pneumophila* sg. 1 (monoclonal Lp1 MAB 1 CRL-1765TM, <http://www.lgcstandards-atcc.org/>) del isotipo IgG₃, se produjo al obtener estos resultados. Este Mab de la ATCC está preparado a partir de una de las legionellas problemáticas pertenecientes al grupo no Pontiac CHOOB y negativas al Mab 3/1 (*L. pneumophila* sg.1 OLDA) lo que es de gran interés, porque es precisamente el grupo que no se detectaba con el Mab LPS-1 H (IgG_{2b}) y que si ha sido posible con el Mab LPS-1 I (IgG₃). Esto podría indicar que para la detección del LPS-1 de *Legionella* serían necesarios mayoritariamente isotipos IgG₃ frente a otros, sobre todo en muestras ambientales o nosocomiales donde son más frecuentes las legionellas tipo no Pontiac.

6.4.4.6. De la Línea de Especie

El hibridoma que se usó en la preparación de Mab para la línea de especie (ESP) se adquirió a la ATCC (HB8472). Gosting *et al.*⁶⁷ describieron un anticuerpo que reaccionaba con un antígeno común a todas las aislados de *L. pneumophila* evaluados, pero que estaba ausente en el resto de legionellas de otra especie estudiada, resultando ser MOMP, como Nolte y Conlin⁶⁴ demostraron. Este Mab se designó como LP3IIG2. Su utilidad por tanto debía ser para reconocer los serogrupos 1 a 15 de *L. pneumophila*, permitiendo entonces tener una línea para diferenciar sg. 1 de serogrupos 2 a 15.

6. DISCUSIÓN

Tal y como se había hecho con los anteriores Mab, se conjugó al oro y se dosificó en membrana. Cuando se recibió dicho Mab ya se habían desarrollado las líneas de GÉN y SR1 por lo que se partió de los métodos y los reactivos desarrollados para éstas. Se comenzó viendo la **funcionalidad del Mab** con la muestra tratada y sin tratar y, como se observa en la tabla 5.6.6.1., con la muestra no tratada el resultado no fue adecuado, mientras que con el tratamiento mejoraba, aunque no era apropiado para todas las muestras positivas (tabla 5.6.6.2.), ya que por ejemplo con *L. pneumophila* sg. 6 y sg. 13 la respuesta fue negativa. Se pasó al estudio de la rotura por **métodos químicos**. Nolte y Conlin⁶⁴ o Gosting *et al.*⁶⁷ entre otros^{33, 60, 151}, comentan que para la total exposición de dicho antígeno de membrana se recomienda el uso de EDTA y detergentes por lo que se estudió la adición de este compuesto al medio NTP. González Sosa *et al.*³³ utilizaron concentraciones de 5 y 10 mM de EDTA mientras de Gosting *et al.*⁶⁷ usaron EDTA 100 mM, en sus respectivos experimentos. En nuestro caso se eligió EDTA 10 mM como punto de partida ya que 100 mM se consideró una concentración elevada, puesto que con 5 y 10 mM se había demostrado previamente la extracción³³. Con 10 mM de EDTA (tabla 5.6.6.3.) se eliminaban los fondos en la muestra negativa en el medio sin tamponar NTP, pero la respuesta era mucho menor, aunque la señal inespecífica de NTP era igual a la de la muestra positiva, por lo que en realidad el valor obtenido con FNTP era un buen resultado, ya que era negativa para *E. coli* y daba algo de señal para *L. pneumophila* sg. 1. Otro de los factores que recomendaban estos autores era el uso combinado de detergentes y EDTA, indicándose para ello detergentes aniónicos como el ácido deoxicolato (AD) o N-laurilsarcosina (NL)^{60, 67}. Se comenzó estudiando la mezcla EDTA-AD comparando con los componentes por separado, y se comprobó que la mezcla funcionaba mejor que ambos individualmente (tabla 5.6.6.4.). Se analizó menor cantidad de EDTA, manteniendo la proporción de AD y también con el medio FNTP, viéndose nuevamente que la combinación de EDTA-AD era la mejor opción, pero que podía ir combinada con el medio FNTP, que por su cuenta no aportaba una solución, pero que junto a estos reactivos no interfería en la reacción (tabla 5.6.6.5.). Por otro lado, la adición de mayor cantidad de AD a la mezcla EDTA-AD no proporcionaba un aumento de la señal (tabla 5.6.6.6.). El siguiente paso fue ver el otro detergente recomendado. Se probó al mismo tanto por ciento que se había hecho con AD y superiores y con EDTA 1 mM, que pareció ir bien en las pruebas anteriores. El detergente NL sólo no funcionó (ver tabla 5.6.6.7.) mientras que combinado con EDTA dio buenos resultados (ver tabla 5.6.6.8.), mejorando los obtenidos con AD. Se determinó que entre 2 y 4 % de NL junto con EDTA 1 mM en el medio de reacción era eficiente para conseguir la exposición de MOMP en la membrana y permitir que el Mab

LP3IIG2 reconociese a dicho antígeno. Como ya se había desarrollado el medio común para las líneas GÉN y SR1, se pensó en la adición de EDTA y NL al pad de muestra para eliminarlo del medio^{101, 161, 162, 164}. Se probaron diferentes cantidades de NL manteniendo EDTA y se analizó con medio FNTP (ver tabla 5.6.6.9.), encontrándose que la cantidad de NL en el pad podía ser mucho menor que en el medio líquido y que además era posible su uso en el mismo. Esto permitió un contacto directo de la muestra con los agentes bloqueantes. Con estas condiciones se probaron algunas cepas de *L. pneumophila* obteniendo un resultado muy positivo, debido a que las muestras negativas *E. coli* y *Salmonella* no daban señal, mientras que *L. pneumophila* sg. 1 Oxford y Philadelphia, así como *L. pneumophila* sg. 5 sí lo hacían claramente, como se observa en la tabla 5.6.6.10.

6.4.4.7. De los Resultados con el Sistema Inmunocromatográfico Final

6.4.4.7.1. De la Unión de las Líneas

Una vez obtenida las condiciones de cada línea, se analizaron diversas muestras de colección (grupo I) (ver tabla 5.6.7.1.) y se vio que las líneas funcionaban correctamente con sus pads de muestra bloqueados correspondientes y con el medio FNTP común. El aumento del **tiempo** y la **temperatura de incubación** (ver tablas 5.6.7.2. y 5.6.7.3.) permitieron eliminar el doble paso de incubación a TA y a 95°C, lo que simplificó el protocolo a seguir, quedándose en una única incubación a 95°C que favorecía el resultado. La optimización del sistema continuó con el estudio de la unión de líneas en un mismo strip, por lo que se planteó la posibilidad de juntar las líneas de SR1 y ESP, ya que ambas se referían a *L. pneumophila*, mientras que se tendría otra tira para la línea GÉN, que era común para todas las legionellas. Se combinaron pads de muestra con líneas y conjugados y se vio que la unión de conjugados y pads para SR1 y ESP era posible (ver tabla 5.6.7.4.) ya que el pad con EDTA y NL no afectaba a la señal de SR1 y la de ESP se mantenía con la mezcla de ambos conjugados.

De nuevo se estudiaron con el sistema colonias vivas a distintos tiempos (15 y 30 minutos) procedentes de placas inoculadas, tal y como se realizaría el test, obteniendo que con 15 minutos era suficiente para alcanzar una buena señal, ya que con 30 minutos no mejoraba demasiado, como se observa en la tabla 5.6.7.5. Como las muestras se utilizaron a McF1 en el desarrollo y las procedentes de las placas presentaban mayor turbidez, se analizaron muestras negativas a McF4 (A60: 0.6-0.7, $\sim 12 \times 10^8$ UFC/ml). No se produjeron resultados

6. DISCUSIÓN

inespecíficos a mayor cantidad de muestra, como puede verse en el tabla 5.6.7.6. El sistema quedó por tanto como se muestra en la tabla 5.6.7.8.

6.4.4.7.2. Del Sistema Final

Con el sistema inmunocromatográfico puesto a punto se comenzó el **análisis de muestras**. Se usó una concentración en las mismas de McF1 (A600:0.25) que era equivalente a $\sim 3 \times 10^8$ UFC/ml^{133, 134} con el objetivo de normalizar todas las muestras y forzar al sistema con máxima sensibilidad, ya que el protocolo a partir de cultivos vivos se realizaba con 2 colonias de entre 1 y 3 mm, que proporcionaba más turbidez al medio, indicando que había mayor cantidad de UFC/ml en el mismo. El tipo de resultados obtenidos es el que se puede ver en la figura 5.7.1., que muestra las diferentes bandas que pueden obtenerse. Para todos ellos se puede observar la línea control en la parte superior del strip en ambos lados, e indica que el test se ha ejecutado correctamente. Su ausencia en una muestra invalida el resultado de la misma (ver tabla 5.7.1.). La posición de dichas líneas puede verse en la figura 6.4.4.7.2.1.

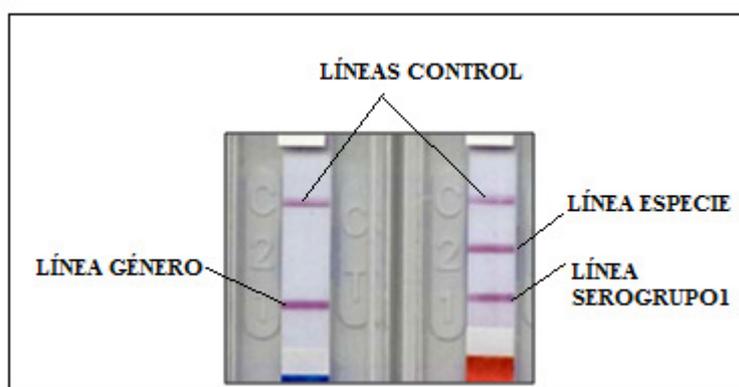


Figura 6.4.4.7.2.1. Posición de las bandas en los strips.

Cuando la muestra es una *Legionella* sp., el resultado es el que se obtiene en el caso A de la figura 5.7.1., siendo por tanto positiva sólo la línea de GÉN y la línea control. Cuando se trata de una muestra de *L. pneumophila* sg. 1 el resultado es el que se observa en la figura 5.7.1. B donde todas las bandas son positivas. Si es *L. pneumophila*, pero no del sg. 1, el resultado es el que se muestra en la figura 5.7.1. C, donde las líneas de GÉN y de ESP muestran color, pero no la de SR1. Finalmente, cuando sólo aparecen las líneas control, es indicativo de que la muestra no es del género *Legionella*, y esto es lo que puede verse en la figura 5.7.1. D. Cuando una muestra es *L. pneumophila* sg. 1, la línea de ESP es también positiva debido a que el Mab de la ATCC reconoce a MOMP que se encuentra en todas las *L. pneumophila*^{60, 64}, como ya se ha comentado. Este resultado obtenido se ve confirmado con

doble línea de detección para *L. pneumophila* sg. 1, que es la de mayor interés en el diagnóstico, ya que el 70-80 % de los casos de neumonía severa causados por *L. pneumophila* se deben a este serogrupo². Como ya se comentó en el apartado 1.2. del capítulo Introducción, otros serogrupos distintos al sg. 1 de *L. pneumophila* e incluso otras especies de *Legionella* pueden causar enfermedad^{1, 21}, por lo que es interesante poder diferenciar los serogrupos presentes en una muestra. En algunas zonas geográficas unas especies son más frecuentes y causantes de LD que en otras⁴, pero sin embargo la mayoría de los test de detección de *Legionella* existentes se dirigen casi exclusivamente al sg. 1 de *L. pneumophila* o a la detección de *L. pneumophila* sin distinguir entre serogrupos. Este es el caso de otras inmunocromatografías existentes en el mercado que usan Mab específicos contra el gen *mip* pero que únicamente pueden diferenciar simultáneamente *Legionella* sp. y *L. pneumophila* sin realizar una distinción del serogrupo. Otros test basados en reacciones de aglutinación con partículas de látex, como el test usado como referencia para el grupo II, son capaces de hacer esta distinción de serogrupos pero para ello es necesaria la realización de tres ensayos diferentes. El test diseñado y evaluado en este trabajo consigue unificar estos requisitos en un solo ensayo aportando por tanto una ventaja significativa a las opciones similares existentes.

Los diferentes **grupos de muestras** fueron: I) 42 muestras de colección procedentes de la ATCC, NCTC y DSMZ; grupo II) 141 muestras ambientales provenientes de 64 muestras de aguas y III) 28 aislados clínicos. Para el grupo I se inocularon placas con las cepas de colección por lo que sólo hubo una especie por placas. En el caso del grupo II, de mayor interés y representativo del trabajo de laboratorio en análisis de aguas, las colonias pueden verse en el ANEXO RESULTADOS, donde se describen y muestran. Para el grupo III las muestras fueron aisladas y caracterizadas en el Hospital Neurotraumatológico de Jaén recibiendo en Vircell, S.L. las placas con aislamientos, teniendo por tanto sólo una especie en la misma. Estas muestras preparadas a McF1 fueron analizadas con el test bajo evaluación siguiendo el protocolo que se había establecido para ello. Las fotos de las muestras positivas pueden verse en la tabla 5.7.2. y las lecturas en la 5.7.3., donde se muestran las lecturas visuales y su interpretación, así como los resultados obtenidos con los métodos de referencia. En la tabla 5.7.2. se observa que todas las líneas control aparecieron, indicando que el flujo y el término de la reacción se llevaron a cabo de manera adecuada y que las líneas mostraron un buen rendimiento al no obtenerse formas incompletas o huecas. Esto es importante como comenta Jones^{108, 164} y que se ha explicado anteriormente en el apartado 6.3.

6. DISCUSIÓN

En la tabla 5.7.3. se puede comprobar que para el grupo I, las 42 muestras de *Legionella* fueron correctamente clasificadas, así como para los aislados clínicos del grupo III. En el caso del grupo II se usó como referencia el *Legionella* Latex Test (Oxoid, UK). Una muestra ambiental clasificada por este látex como *L. pneumophila* sg. 1, para el test inmunocromatográfico era *L. pneumophila* serogrupos 2 a 15 (muestra 3187.1 (posición 157 de la tabla 5.7.3.)). Esta muestra fue analizada por un test de ELISA comercial (Bartels ELISA *Legionella* Urinary Antigen (Bartels, Ireland)) junto a otras cepas de colección como controles y el resultado para dicha muestra fue negativo. También se realizó un ensayo de inmunofluorescencia, en el que las mismas cepas usadas como muestra en el ELISA comercial, se sensibilizaron en porta-objetos y se analizaron con los Mab de LPS-1 que se habían usado en el test, el anticuerpo anti *L. pneumophila* sg. 1 Lp1 MAB 1 de la ATCC (CRL-1675TM, isotipo IgG₃) así como con un anticuerpo policlonal de conejo anti LPS-1 desarrollado en el laboratorio. Por ambos ensayos la muestra problemática fue negativa, como puede verse en la tabla 5.8.1. Esto podría indicar que el *Legionella* Latex Test (Oxoid, UK) pudo proporcionar un resultado erróneo en este caso.

La **tabla de doble entrada** con el resumen de los resultados por grupos para las diferentes líneas en función de si la muestra es género *Legionella*, *L. pneumophila* sg. 1 o serogrupos 2 a 15, se presenta en la tabla 5.7.4. En la 5.9.1. se pueden ver las tablas de doble entrada para todas las líneas por grupos y líneas, y la tabla 5.9.2. lo muestra globalmente. Un primer análisis de los resultados presenta una clasificación muy acertada de las muestras. En cuanto al grupo I, en el que las muestras vienen determinadas por la ATCC, NCTC o DSMZ, lo único que se podía esperar era un resultado coherente a la especie existente en la placa inoculada con dichas cepas. Los Mab de LPPA funcionaron apropiadamente, indicando con total seguridad que estos cultivos fueron caracterizados correctamente, siendo por tanto LPPA un marcador excelente del género de la bacteria, como se comentó anteriormente respecto a los resultados de Rojas *et al.*¹³⁵ (no publicados) o Kim *et al.*³⁷ (ver apartado 6.1.). En adición, los Mab de LPS-1 y el Mab de la ATCC que se encuentra en la línea de especie, clasificaron igualmente bien las muestras demostrando su validez como marcadores de sg. 1 y serogrupos 2 a 15 respectivamente.

En la tabla 5.9.3. se exhiben los diferentes **parámetros estadísticos** calculados a partir de las tablas de doble entrada realizadas con los resultados obtenidos. La sensibilidad es prácticamente del 100 % si no se obvia el resultado negativo obtenido frente al método de

referencia. Esta muestra reanalizada con un ensayo de ELISA comercial y con ensayos de inmunofluorescencia realizados en el laboratorio proporcionó un resultado negativo a *L. pneumophila* sg. 1, indicando que quizás el látex de referencia podía haber producido un resultado erróneo, cómo ya se ha comentado. Si esta muestra se omitiese del cálculo la sensibilidad estaría en el 100%. En el caso de la especificidad, el rendimiento del test fue muy bueno debido a que no se obtuvo ningún falso positivo. Este resultado fue apoyado con el crecimiento en paralelo de las colonias obtenidas en las muestras de aguas en agar-sangre, ya que se encontró que las colonias que habían crecido en agar *Legionella* y que daban positivo para *Legionella* no crecían en dicho agar sangre. Los valores predictivos representan la probabilidad de identificar correctamente los casos positivos (valor predictivo positivo, VPP) o negativos (valor predictivo negativo, VPN)^{141, 143} y en este caso para VPP esta probabilidad es del 100% mientras que para VPN es del 100% para género y especie, pero del 99.4% para la línea de serogrupo 1. Este resultado es muy positivo ya que con casi un 100% de probabilidad se estarían clasificando correctamente todos los especímenes. Las tasas de verosimilitud también se relacionan con la probabilidad de la respuesta¹⁴¹, pero en este caso respecto a la ausencia o presencia de la condición. La tasa de verosimilitud positiva (LRP) tiende a infinito para todas las líneas, mientras que la tasa de verosimilitud negativa (LRN) es 0 para género y especie y casi 0 para la línea de serogrupo 1, indicando dichos resultados que tanto la sensibilidad como la especificidad del test son elevadas. Como medidas de exactitud del test se han calculado la exactitud (AC) y el índice de Youden (γ). El valor ideal para un clasificador en ambos parámetros es 1. Para el test desarrollado, el valor de AC y de γ es 1 para género y especie, mientras que es casi 1 para la línea de serogrupo 1. Estos valores indican por tanto que este test clasifica con acertada probabilidad las muestras y que no lo hace de forma aleatoria.

La representación gráfica para cada línea de la sensibilidad frente a 1-especificidad, produce las **curvas ROC**^{138, 141-144}, como pueden observarse en la figura 5.9.1., y que representan visualmente el rendimiento del test como clasificador. Cuando la especificidad y la sensibilidad son del 100%, el valor del área bajo la curva vale 1 o gráficamente es un ángulo recto. Cualquier desviación de esta situación ideal, muestra la pérdida de idoneidad del clasificador. En el test desarrollado, para género y especie la curva es ideal mientras que para la línea de serogrupo 1 hay una pequeña desviación, siendo el área bajo la curva de 0.984, debido al resultado discrepante que el test produjo frente al método de referencia. Globalmente, los parámetros calculados para el rendimiento del test (ver tabla 5.9.4.) indican

6. DISCUSIÓN

que, al igual que por líneas, la sensibilidad, la especificidad, los valores VPP, VPN, LRP y LRN, así como la AC y el γ , son elevados y el test no produce clasificaciones aleatorias. En la figura 5.9.2., se representa la curva ROC obtenida para el test globalmente, obteniendo que es prácticamente ideal con un área bajo la curva de 0.994.

6.4.4.7.3. Del Límite de Detección del Test

Dado que las muestras se habían analizado a McF1 para normalizar el sistema de evaluación y que el método desde placa proporciona mayor cantidad de UFC/ml en la disolución, se estudió la cantidad mínima de UFC/ml que se podía detectar con el test. La disolución original de la que se partió proporcionó un valor de A600 de 1.0460 que es cuatro veces mayor que el valor de 0.25 para McF1 y un valor de 1.54×10^9 UFC/ml. Tras diluir hasta 1/10.000.000 e inocular placas de agar *Legionella* con dichas diluciones, se pudo detectar por el test hasta la dilución 1/100 para la línea GÉN y SR1 mientras que fue hasta la dilución 1/10 para la de ESP, como se aprecia en la tabla 5.10.1. Por tanto, los límites de detección calculados fueron del orden de 10^7 UFC/ml para la línea GÉN y SR1 y de 10^8 UFC/ml para la línea de especie, como se muestra en la tabla 5.10.2. Este límite de detección, comparado con otras inmunocromatografías similares (Merck, KGaA) o kits de aglutinación con látex (Oxoid, UK) es similar, debido a que con al menos una colonia el test funcionó adecuadamente (ver tabla 5.6.3.9.). Evidentemente es bastante menor que el obtenido con técnicas moleculares de PCR^{191,192}, aunque el cultivo y la inmunocromatografía no presentan las limitaciones de esta técnica tan compleja.

6.4.4.7.4. De las Estabilidades de los Strips y el Medio

Tras el análisis de las muestras, los resultados fueron muy prometedores. Sin embargo, era necesario conocer la estabilidad de los componentes para su uso en un tiempo prolongado. Para ello se sometieron por separado a pruebas de estrés térmico para estudiar su comportamiento con la temperatura y extrapolarlo a un largo tiempo, como explica Jones¹⁰⁸. Según este autor la incubación a 37°C en estudios de estabilidad acelerada tiene un factor en el tiempo de 10, es decir, 1 semana a 37°C sería equivalente a 10 semanas a TA. Otros estudios realizados por Weiss¹⁹³ sugieren que se pueden realizar estas estabilidades tanto a 37 como a 50°C y que la equivalencia puede encontrarse en 3 meses a TA por cada mes sometido a estrés térmico. En este estudio se introdujeron los **strips** en una estufa con una temperatura de 50°C durante 1 semana y por otro lado, se guardaron para analizarlos a TA en el periodo de

un año. El resultado que se muestra en la tabla 5.11.1.1. pone de manifiesto que en el periodo de al menos un año a TA conservados en ausencia de luz y humedad, los strips fueron estables al igual que tras someterlos a estrés térmico a 50°C, observando un ligero decaimiento en la línea de SR1, mientras que en la de ESP aumentaba la señal, quizás debido a un fenómeno de maduración del Mab en la línea o el conjugado^{101, 108, 163}. En el caso de la línea género se mantuvo la señal. Estos resultados indicarían por tanto que los strips, en los que los Mab van adsorbidos en la membrana y en el conjugado, mantendrían su integridad y por tanto, el sistema podría responder a largo plazo de igual manera que recién preparado, lo que sin duda era un paso positivo de cara al uso del test en el tiempo o a su posible comercialización.

El **medio de rotura** diseñado era otro componente esencial del test y no menos importante que las líneas o el conjugado, ya que es el que provoca la exposición correcta de los antígenos de la membrana de la bacteria de *Legionella* que se desean detectar con el test. El hecho de que PMB fuese estable en disolución por un tiempo determinado (<http://www.sigmaaldrich.com>, producto 81334), hizo que se pensara en la liofilización del mismo¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ para preservar la estabilidad del medio en el tiempo. Tras su liofilización se sometió a 50°C durante 1 y 2 meses y se comparó en paralelo al mismo medio liofilizado pero conservado a TA. El resultado que se muestra en la tabla 5.11.2.1. A determina que el medio funcionó perfectamente tras ser sometido a estrés térmico, lo que indicaba su estabilidad en el tiempo. Por otro lado, como Percy¹⁹⁴ expone, los liofilizados pueden conservarse a TA y son estables por largos periodos de tiempo, lo que sin duda era otra ventaja para el interés comercial del test, porque permitiría su almacenamiento a TA. Para comprobar su posible uso en líquido, se probó uno de los viales que había sido reconstituido tras la liofilización y almacenado a TA. Como puede verse en la tabla 5.11.2.1. B funcionó también sin problemas, por lo que su utilización a TA y en estado líquido también era posible.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

La importancia de un diagnóstico reside en una apropiada clasificación del agente causante de la enfermedad. Para ello se ha estudiado y desarrollado un test para la identificación de *Legionella* a partir de muestras de cultivo. Tras el desarrollo y evaluación del mismo, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- Los métodos de rotura químicos de la membrana de la bacteria han demostrado ser más eficaces que los físicos, indicando que la acción de detergentes o compuestos que interaccionan y desestabilizan dicha membrana, son necesarios para la completa exposición a los monoclonales específicos de los constituyentes de la misma que se desean detectar.

- La conjugación a partículas de oro coloidal de anticuerpos monoclonales, así como la adsorción de éstos sobre membranas de nitrocelulosa, posibilita el desarrollo de sistemas inmunocromatográficos capaces de detectar antígeno en muestras procedentes de cultivo.

- Dado que el cultivo para la detección de *Legionella* es obligatorio en gran número de países, entre ellos España, el test desarrollado para muestras de cultivo, se presenta como una opción apropiada como método de confirmación del mismo, con alta sensibilidad y especificidad, así como un elevado rendimiento de los parámetros estadísticos calculados, como muestran las gráficas ROC generadas del análisis de los datos.

- Otros métodos de detección, como los basados en el análisis de ácidos nucleicos con sensibilidad y especificidad variables, usualmente no diferencian entre organismos viables y no viables, mientras que el cultivo sólo puede realizarse con cepas vivas, que son las causantes de la enfermedad, siendo así un método más preciso. Aquí reside otra de las ventajas del método desarrollado en el presente trabajo, donde los especímenes detectados pertenecerán a legionellas potencialmente patógenas.

- El test está diseñado con anticuerpos monoclonales específicos dirigidos frente a componentes constantes de la membrana de la bacteria *Legionella*, como son PAL, LPS-1 o MOMP. Éste hecho permitiría la detección de cualquier nueva especie que pudiese surgir en el futuro, haciendo de este test un método de detección muy eficaz.

7. CONCLUSIONES

- La inmunocromatografía desarrollada ha sido capaz de identificar las legionellas tipo Pontiac y no-Pontiac, así como muestras de procedencia ambiental y clínica obtenidas a partir de cepas de colección o muestras aisladas. Todo esto incluye los casos nosocomiales, adquiridos en comunidad o asociados al viajero, lo que convierte al test en un método versátil.

-En caso de su aplicación comercial, frente a otras técnicas de confirmación usadas habitualmente, como son los test de tarjeta con partículas de poliestireno, necesita de un solo ensayo, mientras que los de tarjeta requieren en la mayoría de los casos de hasta tres. Éstos suelen estar diseñados con mezclas de policlonales frente a las legionellas más frecuentes, pero no para todas las especies y géneros existentes. Además en una sola prueba del método inmunocromatográfico, puede determinarse si es una muestra del género *Legionella* o diferenciar entre *L. pneumophila* serogrupo 1 y *L. pneumophila* serogrupos 2 a 15, lo que aporta rapidez y sencillez al diagnóstico. La doble confirmación de *L. pneumophila* serogrupo 1 implica además, fiabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ulloa, F.M. (2008) [*Legionella pneumophila*]. *Rev Chilena Infectol* 25, 208
2. Fields, B.S., *et al.* (2002) Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15, 506-526
3. Doleans, A., *et al.* (2004) Clinical and environmental distributions of Legionella strains in France are different. *J Clin Microbiol* 42, 458-460
4. Percival, S.L. (2004) Legionella. In *Microbiology of waterborne diseases*, 145-153, Elsevier
5. Park, M.Y., *et al.* (2003) Legionella busanensis sp. nov., isolated from cooling tower water in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 77-80
6. McDade, J.E., *et al.* (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 297, 1197-1203
7. Gimenez, D.F. (1964) Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures. *Stain Technol* 39, 135-140
8. Washington C. Winn, J. (1988) Legionnaires Disease: Historical Perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 1, 60-81
9. Joly, J.R., *et al.* (1986) Development of a standardized subgrouping scheme for Legionella pneumophila serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 23, 768-771
10. Diederens, B.M., *et al.* (2009) Evaluation of the Oxoid Xpect Legionella test kit for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine. *J Clin Microbiol* 47, 2272-2274
11. Furugen, M., *et al.* (2008) Legionella pneumonia caused by Legionella pneumophila serogroup 2: second case report in Japan. *J Infect Chemother* 14, 161-165
12. Weston, D. (2008) Infection prevention and control : theory and clinical practice for healthcare professionals. p. 271-278, John Wiley & Sons
13. Gutiérrez Molina, C., *et al.* (2002) Brote de Legionelosis en Murcia en Julio de 2001. La óptica de Sanidad Ambiental. *Revista de Sanidad Ambiental* 2 22-31
14. Garcia-Fulgueiras, A., *et al.* (2003) Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis* 9, 915-921
15. Saucá Subías, G., and López García, P. (2004) Brotes Comunitarios de Legionelosis: la Experiencia de Dos Laboratorios de Microbiología de Hospitales Comarcales. *Revisiones temáticas de Control de Calidad de la SEIMC* Volume, 1-11 DOI:
16. Gómez López, L.I., and Alonso Pérez de Ágredab, J.P. (2006) Legionelosis, epidemias recurrentes. Brotes en Zaragoza. La desproporción entre el problema de salud y su repercusión. *Revista de Administración Sanitaria Siglo XXI* 4, 675-696
17. Castilla, J., *et al.* (2008) A large Legionnaires' disease outbreak in Pamplona, Spain: early detection, rapid control and no case fatality. *Epidemiol Infect* 136, 823-832
18. Plouffe, J.F., *et al.* (1983) Relationship between colonization of hospital building with Legionella pneumophila and hot water temperatures. *Appl Environ Microbiol* 46, 769-770
19. Ausina, V., *et al.* (2005) Diagnóstico Microbiológico y Control de la Legionelosis. 2005. *Procedimientos en Microbiología Clínica* Volume, DOI:
20. Ludwig, B., *et al.* (1991) Cloning, genetic analysis, and nucleotide sequence of a determinant coding for a 19-kilodalton peptidoglycan-associated protein (Ppl) of Legionella pneumophila. *Infect Immun* 59, 2515-2521
21. Koide, M., *et al.* (2008) Characteristics of Legionella pneumophila serogroup 2 strains by colony morphology. *Jpn J Infect Dis* 61, 487-489

22. Hornei, B., Ewig, S., Tartakovsky, I., Lajoie, L., Surman-Lee, S., Fry, N., Fields, B. (2007) Laboratory aspects of *Legionella*. In *Legionella and the Prevention of Legionellosis* (Bartram, J., *et al.*, eds), p. 175-192, In Jamie Bartram (ed), *Legionella and the prevention of legionellosis*, World Health Organization
23. Washington C. Winn, J. (1999) *Legionella*. In *Manual of clinical microbiology* (7th edn), p. 572-585, ASM Press
24. Fields, B.S. (2002) The Social Life of Legionellae. In *Legionella*, p. 135-142, In Marre Reinhard (ed), *Legionella*, ASM Press
25. Costa, J., *et al.* (2005) Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 71, 663-671
26. Swanson, M.S., Bachman, Michael A. (2002) *The Legionella pneumophila life cycle: connections between growth phase, virulence expression, and replication vacuole genesis*. In Reinhard Marre (ed), *Legionella*, ASM Press
27. Vincent, C.D., *et al.* (2006) The *Legionella pneumophila* Dot/Icm Type IV secretion system. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 184-191, In Nicholas P. Cianciotto (ed), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, ASM Press
28. Vincent, C.D., *et al.* (2006) Defining the translocation pathway of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 195-198, In Nicholas P. Cianciotto (ed), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, ASM Press
29. Segal, G., and Shuman, H.A. (2002) Genetic analysis of *Legionella pneumophila* intracellular multiplication in human and protozoan hosts. In *Legionella*, p. 90-96, In Marre Reinhard (ed), *Legionella*, ASM Press
30. Shuman, H.A., *et al.* (2006) Function of *Legionella* effectors. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 177-183, In Nicholas P. Cianciotto (ed), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, ASM Press
31. Helbig, J.H., *et al.* (1995) Monoclonal antibodies to *Legionella* Mip proteins recognize genus- and species-specific epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2, 160-165
32. Cascales, E., *et al.* (2002) Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J Bacteriol* 184, 754-759
33. González Sosa, N.L., *et al.* (2002) *Legionella pneumophila*: extracción de la proteína principal de la membrana externa (p 29). *Rev Cubana Med Trop* 54, 91-95
34. Jurgens, D., and Fehrenbach, F.J. (1997) Identification of *Legionella* species by lipopolysaccharide antigen pattern. *J Clin Microbiol* 35, 3054-3057
35. Tang, P.W., *et al.* (1984) *Legionella bozemanii* serogroup 2: a new etiological agent. *J Clin Microbiol* 19, 30-33
36. Ratcliff, R.M., *et al.* (1998) Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *J Clin Microbiol* 36, 1560-1567
37. Kim, M.J., *et al.* (2003) Characterization of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* 41, 2974-2979
38. Moon, J.-H., *et al.* (2006) Antigenic diversity of a 19-kilodalton peptidoglycan-associated lipoprotein among *Legionella* species determined by reactivity patterns to monoclonal antibodies. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 76-78, In Nicholas P. Cianciotto (ed), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, ASM Press
39. Godlewska, R., *et al.* (2009) Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS Microbiol Lett* 298, 1-11

40. Bouveret, E., *et al.* (1999) In vitro characterization of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL)-peptidoglycan and PAL-TolB interactions. *J Bacteriol* 181, 6306-6311
41. Engleberg, N.C., *et al.* (1986) Antibodies isolated by using cloned surface antigens recognize antigenically related components of Legionella pneumophila and other Legionella species. *J Immunol* 136, 1415-1417
42. Jurgens, D., and Fehrenbach, F.J. (1995) Cross-reacting lipopolysaccharide antigens in Legionella pneumophila serogroups 1 to 14. *Infect Immun* 63, 2180-2184
43. Kim, M.J., *et al.* (2006) A peptidoglycan-associated lipoprotein of Legionella pneumophila activates Toll-like receptor 2 in murine macrophages. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 321-322, In Nicholas P. Cianciotto (ed), Legionella: state of the art 30 years after its recognition, ASM Press
44. Whitfield, N.N., and Swanson, M.S. (2006) Lag-1 acetylation of lipopolysaccharide. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 265-268, In Nicholas P. Cianciotto (ed), Legionella: state of the art 30 years after its recognition, ASM Press
45. Boissinot, M., *et al.* (1987) Antigenic variability of the outer membrane antigens of Legionella pneumophila serogroups 1 to 8. *Can J Microbiol* 33, 607-613
46. Nolte, F.S., *et al.* (1986) Electrophoretic and serological characterization of the lipopolysaccharides of Legionella pneumophila. *Infect Immun* 52, 676-681
47. Zou, C.H., *et al.* (1999) Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O acetylation of the O polysaccharide of Legionella pneumophila serogroup 1 lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 181, 4137-4141
48. Barthe, C., *et al.* (1988) Common epitope on the lipopolysaccharide of Legionella pneumophila recognized by a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 26, 1016-1023
49. Shevchuk, O., *et al.* Virulence properties of the legionella pneumophila cell envelope. *Front Microbiol* 2, 74
50. Hellman, J., *et al.* (2003) Murein lipoprotein, peptidoglycan-associated lipoprotein, and outer membrane protein A are present in purified rough and smooth lipopolysaccharides. *J Infect Dis* 188, 286-289
51. Helbig, J.H., *et al.* (1997) Antigenic lipopolysaccharide components of Legionella pneumophila recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol* 35, 2841-2845
52. Petitjean, F., *et al.* (1987) Partial characterization of a Legionella pneumophila serogroup 1 immunodominant antigenic determinant recognized by a monoclonal antibody. Legionella specific antigenic determinant. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 10, 9-23
53. Lück, P.C., Schuppler, M., Helbig, J.H. (2002) Changes in the lag-1 locus of Legionella pneumophila serogroup 1 strains results in different lipopolysaccharides by monoclonal antibodies but do not influence virulence. In *Legionella*, p. 52-55, In Marre Reinhard (ed), Legionella, ASM Press, p. 52-55
54. Conlan, J.W., and Ashworth, L.A. (1986) The relationship between the serogroup antigen and lipopolysaccharide of Legionella pneumophila. *J Hyg (Lond)* 96, 39-48
55. Petitjean, F., *et al.* (1984) Standardization for diagnostic purposes of a monoclonal antibody against Legionella pneumophila. *Dev Biol Stand* 57, 99-105
56. Lema, M., and Brown, A. (1983) Electrophoretic characterization of soluble protein extracts of Legionella pneumophila and other members of the family Legionellaceae. *J Clin Microbiol* 17, 1132-1140
57. Para, M.F., and Plouffe, J.F. (1983) Production of monoclonal antibodies to Legionella pneumophila serogroups 1 and 6. *J Clin Microbiol* 18, 895-900
58. Helbig, J.H., *et al.* (2002) Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21, 710-716

59. Helbig, J.H., *et al.* (2006) Lipopolysaccharide architecture of *Legionella pneumophila* grown in broth and host cells. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 261-264, In Nicholas P. Cianciotto (ed), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, ASM Press
60. Butler, C.A., *et al.* (1985) Disulfide-bonded outer membrane proteins in the genus *Legionella*. *Infect Immun* 48, 14-18
61. Hindahl, M.S., and Iglewski, B.H. (1984) Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. *J Bacteriol* 159, 107-113
62. Heuner, K., *et al.* (2002) Function and expression of *Legionella pneumophila* surface factors. In *Legionella*, p. 43-48, In Marre Reinhard (ed), *Legionella*, ASM Press
63. Gabay, J.E., and Horwitz, M.A. (1985) Isolation and characterization of the cytoplasmic and outer membranes of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*). *J Exp Med* 161, 409-422
64. Nolte, F.S., and Conlin, C.A. (1986) Major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* carries a species-specific epitope. *J Clin Microbiol* 23, 643-646
65. Gabay, J.E., *et al.* (1985) Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *J Bacteriol* 162, 85-91
66. Williams, A., and Lever, M.S. (1995) Characterisation of *Legionella pneumophila* antigen in urine of guinea pigs and humans with Legionnaires' disease. *J Infect* 30, 13-16
67. Gosting, L.H., *et al.* (1984) Identification of a species-specific antigen in *Legionella pneumophila* by a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 20, 1031-1035
68. Fallon, R.J. (1978) Antibiotic therapy in Legionnaire's disease. *J Antimicrob Chemother* 4, 106-107
69. Fraser, D.W., *et al.* (1978) Antibiotic treatment of guinea-pigs infected with agent of Legionnaires' disease. *Lancet* 1, 175-178
70. Birteksöz, A.S., *et al.* (2006) In vitro activities of various antibiotics against *Legionella pneumophila*. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 43-46, In Nicholas P. Cianciotto (ed), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, ASM Press
71. Roitt, I., *et al.* (1997) Técnicas Inmunológicas. In *Inmunología*, p. 28.21-28-15, Times Mirror International Publishers Limited, 4th edition en español
72. Higa, F., *et al.* (2008) Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in respiratory samples using an immunochromatographic membrane test. *J Microbiol Methods* 74, 121-122
73. Helbig, J.H., *et al.* (2006) Evaluation of the Duopath *Legionella* lateral flow assay for identification of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species culture isolates. *Appl Environ Microbiol* 72, 4489-4491
74. Helbig, J.H., Lück, P. C., Kunz, B., Bubert, A. (2006) Duopath *Legionella*: a new immunochromatographic test for simultaneous identification of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species. In *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, p. 73-75, In Nicholas P Cianciotto, *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, ASM Press, p. 73-75.
75. Rojas, A., *et al.* (2005) Value of serological testing for diagnosis of legionellosis in outbreak patients. *J Clin Microbiol* 43, 4022-4025
76. Edelstein, P.H., and Finegold, S.M. (1979) Use of a semiselective medium to culture *Legionella pneumophila* from contaminated lung specimens. *J Clin Microbiol* 10, 141-143
77. Bartie, C., *et al.* (2003) Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Res* 37, 1362-1370
78. Verran, J., *et al.* (1995) Comments on the routine testing of water samples for *Legionella* sp. *Water Research* 29, 1595-1598

79. de Ory, F., and Minguito, T. (2009) [Comparison of five commercial assays for the detection of *Legionella pneumophila* antigens in urine]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27, 81-84
80. Campbell, A.M. (1996) Production and purification of antibodies. In *Immunoassay*, p. 95-115, In Diamandis, Eleftherios P.Christopoulos, Theodore K., Immunoassay, Academic Press
81. Lück, P.C., *et al.* (2006) Diagnostics and clinical disease treatment: usefulness of microbiological diagnostic methods for detection of *Legionella* infections. In *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, p. 15-21, In Nicholas P Cianciotto, *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, ASM Press, p. 73-75.
82. Helbig, J.H., and Lück, P.C. (2006) Serotyping of *Legionella pneumophila* in epidemiological investigations: limitations in the era of genotyping. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 68-72, In Nicholas P. Cianciotto (ed), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, ASM Press
83. Wreghitt, T.G., *et al.* (1982) An ELISA test for the detection of antibodies to *Legionella pneumophila*. *J Clin Pathol* 35, 657-660
84. Leland, D.S., and Kohler, R.B. (1991) Evaluation of the L-CLONE *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Urine Antigen Latex Test. *J Clin Microbiol* 29, 2220-2223
85. Sathapatayavongs, B., *et al.* (1983) Rapid diagnosis of Legionnaires' disease by latex agglutination. *Am Rev Respir Dis* 127, 559-562
86. Helbig, J.H., Uldum, S.A., Lück, P. C., Harrison, T. G. (2002) Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples: recognition of serogroups and monoclonal subgroups. In *Legionella*, p. 204-206, In Reinhard Marre (ed), *Legionella*, ASM Press
87. Horn, J. (2002) Comparison of non-serogroup 1 detection by Biotest and Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassays. In *Legionella*, p. 207-210, In Marre Reinhard (ed), *Legionella*, ASM Press
88. Morris, G.K., *et al.* (1980) *Legionella gormanii* sp. nov. *J Clin Microbiol* 12, 718-721
89. Uldum, S.A., and Mølbak, K. (2002) PCR as a routine method for diagnosis of legionnaires' disease. In *Legionella*, p. 213-215, In Marre Reinhard (ed), *Legionella*, ASM Press
90. Kern, M., *et al.* (2009) Inhibition of *Legionella pneumophila* PCR in respiratory samples: a quantitative approach. *J Microbiol Methods* 79, 189-193
91. Ordóñez Iriarte, J.M. (2002) La nueva normativa estatal frente a la legionelosis: entre la ambición y la realidad. *Gaceta Sanitaria* 16, 105-108
92. Vargas, F. (1999) Recomendaciones para la prevención y control de la legionelosis. (Ministerio de Sanidad y Consumo, S.G.T., ed), ISBN: 84-7670-507-7
93. (1985) Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. In (*BOE n°189, 8-08-1985*), España
94. (2003) REAL DECRETO 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. In (*BOE n°171, 18/07/2003*), p. 28055-28069, Ministerio de Sanidad y Consumo, España
95. (2004) Disposición 352/2004, de 27 de julio, por el que se establecen las condiciones higiénico-sanitarias para la prevención y el control de la legionelosis. In *Diario Oficial de la Generalidad de Cataluña, España*, p. 14726-14733
96. (2005) UNE 100030 IN: Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones. In *AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación)*
97. (2003) REAL DECRETO 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. In (*BOE n°45, 21/02/2003*), p. 7228-7245, Ministerio de la Presidencia, España

98. (1997) REAL DECRETO 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. In (*BOE n°124, 24/05/1997*), p. 16100-16111, Ministerio de la Presidencia, España
99. (2001) REAL DECRETO 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo. In (*BOE n°104, 01/05/2001*), p. 15893-15899, Ministerio de la Presidencia, España
100. (2003) ORDEN SCO/317/2003, de 7 de febrero, por la que se regula el procedimiento para la homologación de los cursos de formación del personal que realiza las operaciones de mantenimiento higiénico-sanitario de las instalaciones objeto del Real Decreto 909/2001, de 27 de julio. In (*BOE n°44, 20/03/2003*), p. 7017-7019, Ministerio de Sanidad y Consumo, España
101. (2006) Rapid Lateral Flow Test Strips: considerations for product development. (Rev. A 07/06 edn), Millipore Corporation
102. (1998) TechNote#25: Immunochromatographic, Lateral Flow or Strip Test - Development Ideas. Bang Laboratories, Inc
103. Tisone, T.C., and O'Farrell, B. (2009) Manufacturing the Next Generation of Highly Sensitive and Reproducible Lateral Flow Immunoassay. In *Lateral Flow Immunoassay* (Wong, R., et al., eds), p. 131-156, Humana Press
104. Ponti, J.S. (2009) Material Platform for the Assembly of Lateral Flow Immunoassay Test Strips. In *Lateral Flow Immunoassay* (Wong, R., et al., eds), p. 51-57, Humana Press
105. Harvey, M.A., et al. (1996) The use of microporous polymer membranes in immunoassays. *IVD Technology* May/June, p. 34-40
106. Beer, H.H., et al. (2002) Qualification of cellulose nitrate membranes for lateral flow assays. *IVD Technology* January, p. 35-42
107. Mansfield, M.A. (2009) Nitrocellulose Membranes for Lateral Flow Immunoassays: A Technical Treatise. In *Lateral Flow Immunoassay* (Wong, R., et al., eds), p. 95-113, Humana Press
108. Jones, K.D. (1999) Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes. Part 1: principles. *IVD Technology* March
109. Tisone, T.C. (2000) In-line manufacturing for rapid-flow diagnostic devices. *IVD Technology* May/June, p. 43-60
110. Tweney, R.D. (2006) Discovering Discovery: How Faraday Found the First Metallic Colloid. *Perspectives on Science* 14, p. 97-121
111. Sharma, V., et al. (2009) Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly. *Materials Science and Engineering R* 65, p. 1-38
112. Frens, G. (1973) Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions. *Nature-Physical Science* 241, 20-22
113. Chandler, J., et al. (2000) The place of gold in rapid test. *IVD Technology* March 1
114. Chun, P. (2009) Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. In *Lateral Flow Immunoassay* (Wong, R., et al., eds), p. 75-93, Humana Press
115. Muangnapoh, T., et al. Facile strategy for stability control of gold nanoparticles synthesized by aqueous reduction method. *Current Applied Physics* 10, 708-714
116. (2009) Ruby Red Colloidal Gold. Copper, Silver and Gold Redox Reactions. Flinn Scientific, Inc.
117. Kaszuba, M., et al. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 368, 4439-4451
118. Brown, K.R., and Natan, M.J. (1998) Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles in Solution and on Surfaces. *Langmuir* 14, 726-728

119. Liu, F., *et al.* (2003) Microwave Heating for the Preparation of Nanometer Gold Particles. *The Japan Society of Applied Physics* 42, p. 4152-4158
120. Mallick, K., *et al.* (2001) Seed-mediated successive growth of gold particles accomplished by UV irradiation: a photochemical approach for size-controlled synthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 140, 75-80
121. Sau, T., *et al.* (2001) Size Controlled Synthesis of Gold Nanoparticles using Photochemically Prepared Seed Particles. *Journal of Nanoparticle Research* 3, 257-261
122. Robinson, N. (2002) Immunogold Conjugation for IVD applications. *IVD Technology* March
123. van der Zande, B.M.I., *et al.* (1999) Colloidal Dispersions of Gold Rods: Synthesis and Optical Properties. *Langmuir* 16, p. 451-458
124. Chaudhuri, B., and Raychaudhuri, S. (2001) Manufacturing high-quality gold sol. *IVD Technology* March
125. Bozlee, B.J., and Exarhos, G.J. (2000) Preparation and characterization of gold and ruthenium colloids in thin zinc oxide films. *Thin Solid Films* 377-378, 1-7
126. Tarozaitè, R., *et al.* (2006) Gold colloids obtained by Au(III) reduction with Sn(II): preparation and characterization. *Chemija* 17, p. 1-6
127. Norman, T.J., *et al.* (2002) Near Infrared Optical Absorption of Gold Nanoparticle Aggregates. *The Journal of Physical Chemistry B* 106, 7005-7012
128. Rico-Moctezuma, A., *et al.* (2010) Biosíntesis de nanopartículas de oro mediante el extracto de *Opuntia ficus-indica*. *Superficies y Vacío* 23, p. 94-97
129. Geoghegan, W.D. (1988) The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold. *J Histochem Cytochem* 36, 401-407
130. Horisberger, M., and Clerc, M.F. (1985) Labelling of colloidal gold with protein A. A quantitative study. *Histochemistry* 82, 219-223
131. Geoghegan, W.D., and Ackerman, G.A. (1977) Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. *J Histochem Cytochem* 25, 1187-1200
132. Hermanson, G.T. (1996) Preparation of Colloidal-Gold-Labeled Proteins. In *Bioconjugate Techniques* (Press, A., ed), p. 593-604, Academic Press Limited
133. Sutton, S. (2011) Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal of Validation Technology* 17, p. 46-49
134. Hindler, J.F., and Munro, S. (2007) Preparation of routine media and reagents used in antimicrobial susceptibility testing. In *Clinical Microbiology Procedures Handbook 2nd edition* (Garcia, L.S., ed), 5.14.11.11-15.14.11.14, ASM Press
135. Rojas, A., *et al.* (2004) Use of a recombinant *Legionella pneumophila* antigen for diagnosis. In *19th Annual Meeting of the European Working Group for Legionella Infections EWGLI2004*
136. Skoog, D.A., *et al.* (1995) Teoría de la espectroscopía de absorción molecular. In *Química Analítica, 6^a Edición*, p. 403-420., McGraw-Hill/Interamericana de México, S.A. de C.V.
137. (2008) TECH TIP#6 Extinction Coefficients. A guide to understanding extinction coefficients, with emphasis on spectrophotometric determination of protein concentration. Pierce Biotechnology
138. Martínez-Cambor, P. (2007) Comparación de pruebas diagnósticas desde la curva ROC. *Revista Colombiana de Estadística* 30, p. 163-176
139. Corneli, G., *et al.* (2005) The cut-off limits of the GH response to GH-releasing hormone-arginine test related to body mass index. *Eur J Endocrinol* 153, 257-264

140. Park, S.H., *et al.* (2004) Receiver operating characteristic (ROC) curve: practical review for radiologists. *Korean J Radiol* 5, 11-18
141. Franco Nicolás, M., and Vivo Molina, J.M. (2007) *ANÁLISIS DE CURVAS ROC. Principios básicos y aplicaciones*. La Muralla, S.A.
142. Burgueño, M.J., *et al.* (1993) Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Medicina Clínica (Barcelona)* 104, p. 661-670
143. Cerda, J., and Cifuentes, L. (2012) Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología* 29, p. 138-141
144. López de Ullibarri Galparsoro, I., and Píta Fernández, S. (1998) Curvas ROC. *Cad de Aten Primaria* 5, p. 229-235
145. Schoonjans, F., *et al.* (1995) MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 48, 257-262
146. Stephan, C., *et al.* (2003) Comparison of eight computer programs for receiver-operating characteristic analysis. *Clin Chem* 49, 433-439
147. Roitt, I., *et al.* (1997) Anticuerpos y sus receptores. In *Inmunología*, p. 4.1-4.12, Times Mirror International Publishers Limited, 4th edition en español
148. Appelmeik, B.J., *et al.* (1992) Polymyxin B-horseradish peroxidase conjugates as tools in endotoxin research. *Anal Biochem* 207, 311-316
149. Matsumoto, A., *et al.* (1973) Electron microscope observations on the effects of polymyxin B sulfate on cell walls of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* 113, 357-364
150. Lindemann, R.A. (1988) Bacterial activation of human natural killer cells: role of cell surface lipopolysaccharide. *Infect Immun* 56, 1301-1308
151. Hancock, R.E. (1984) Alterations in outer membrane permeability. *Annu Rev Microbiol* 38, 237-264
152. (2000) *Legionnaires' disease. The control of legionella bacteria in water systems. Approved Code of Practice and guidance*. Crown, 3rd editon
153. Ricketts, K.D., *et al.* (2008) Survey on legislation regarding wet cooling systems in European countries. *Eurosurveillance* 13, p. 1-5
154. Uldum, S.A., and Helbig, J.H. (2002) Legionella serogroup and subgroup distribution among patients with legionnaires' disease in Denmark. In *Legionella*, p. 200-203, In Marre Reinhard (ed), Legionella, ASM Press
155. Sabrià, M. (2009) Clinical aspects of Legionnaires' Disease. In *7th International Conference of Legionella 2009*, Insitut Pasteur, Paris, France
156. Hornei, B., Ewig, S., Exner, M., Tartakovsky, I., Lajoie, L., Dangendorf, F., Surman-Lee, S., Fields, B. (2007) Laboratory aspects of *Legionella*. In *Legionella and the Prevention of Legionellosis* (Bartram, J., *et al.*, eds), p. 1-27, In Jamie Bartram (ed), Legionella and the prevention of legionellosis, World Health Organization
157. Ginevra, C., *et al.* (2009) Nosocomial infections, *Legionella* strain characterization and host-related risk factors. In *7th International Conference of Legionella 2009*, Insitut Pasteur, Paris, France
158. Helbig, J.H., *et al.* (2007) Identification and serotyping of atypical Legionella pneumophila strains isolated from human and environmental sources. *J Appl Microbiol* 102, 100-105
159. Ratcliff, R.M. (2006) The problem of complexity. In *Legionella : state of the art 30 years after its recognition*, p. 359-366, In Nicholas P. Cianciotto (ed), Legionella: state of the art 30 years after its recognition, ASM Press
160. Carlberg, D. (2005) Lateral-Flow Assays. In *Drugs of Abuse: Body Fluid Testing* (Wong, R.C., and Tse, H.Y., eds), p. 99-114, Humana Press Inc.
161. Butler, J.E. (1996) Solid phases in immunoassay. In *Immunoassay*, p. 205-225, In Diamandis, Eleftherios P.Christopoulos, Theodore K., Immunoassay, Academic Press

162. Mansfield, M.A. (2005) The use of nitrocellulose membranes in lateral-flow assays. In *Drugs of Abuse: Body Fluid Testing* (Wong, R.C., and Tse, H.Y., eds), p. 71-85, Humana Press Inc.
163. Jones, K.D. (May 2000) Lateral flow strip test technology. In *The Latex Course. The development of latex based diagnostic test*, Whatman International Ltd.
164. Jones, K.D. (1999) Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes. Part 2: common problems. *IVD Technology* May
165. O'Farrell, B. (2009) Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. In *Lateral Flow Immunoassay* (Wong, R., et al., eds), p. 1-33, Humana Press
166. Turkevich, J. (1985) Colloidal Gold. Part I. Historical and preparative aspects, morphology and structure. *Gold Bull* 18, p. 86-91
167. Christopher, P., et al. (2005) Antibody-label conjugates in lateral-flow assays. In *Drugs of Abuse: Body Fluid Testing* (Wong, R.C., and Tse, H.Y., eds), p. 87-98, Humana Press Inc.
168. Mandal, S., et al. (2002) Synthesis of a stable gold hydrosol by the reduction of chloroaurate ions by the amino acid, aspartic acid. *Proc Indian Acad Sci (Chem Sci)* 114, p. 513-520
169. Si, S., et al. (2006) A mechanistic and kinetic study of the formation of metal nanoparticles by using synthetic tyrosine-based oligopeptides. *Chemistry* 12, 1256-1265
170. Kohler, G., and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497
171. Scopes, R.K. (1994) Separation by adsorption I: general principles. In *Protein purification : principles and practice* p. 102-145, Springer-Verlag
172. Antibody purification. Handbook. Amersham Biosciences, Edition AC
173. Andrew, S.M., and Titus, J.A. (2001) Purification of immunoglobulin G. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 16, Unit 16.13
174. Josić, D., and Li, Y.-P. (2001) Analytical and Preparative Methods for Purification of Antibodies. *Food technol biotechnol* 39, 215-226
175. Walters, J., et al. (2009) Practical approaches to protein folding and assembly: spectroscopic strategies in thermodynamics and kinetics. *Methods Enzymol* 455, 1-39
176. Senthilraja, M. Determination of spectrophotometric absorptivity by analytical ultracentrifugation. *Indian J Pharm Sci* 73, 436-438
177. Wiener, M.C. (2004) A pedestrian guide to membrane protein crystallization. *Methods* 34, 364-372
178. Kurganov, B.I., et al. (2002) Kinetics of thermal aggregation of tobacco mosaic virus coat protein. *Biochemistry (Mosc)* 67, 525-533
179. Scopes, R.K. (1994) Making an extract. In *Protein purification : principles and practice* p. 22-43, Springer-Verlag
180. Burden, D.W. (2008) Guide to the homogenization of biological samples. *Random Primers*, p. 1-14
181. Neugebauer, J.M. (1990) Detergents: an overview. In *Methods in Enzymology. Guide to protein purification* (Academic Press, I., ed), p. 239-253, Academic Press Limited
182. Wong, R.C., and Tse, H.Y. (2009) Quantitative, False Positive, and False Negative Issues for Lateral Flow Immunoassays as Exemplified by Onsite Drug Screens. In *Lateral Flow Immunoassay* (Wong, R., et al., eds), p. 185-203, Humana Press
183. Kim, I.S., et al. (2009) Evaluation of Methods for Cyanobacterial Cell Lysis and Toxin (Microcystin-LR) Extraction Using Chromatographic and Mass Spectrometric Analyses. *Environ. Eng. Res.* 14, p. 250-254
184. Leite, G.M., et al. (2012) Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: an optimized method for filamentous fungi. *J Microbiol Methods* 88, 413-418

8. BIBLIOGRAFÍA

185. Lee, J.-Y., *et al.* (2010) Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 101, S75-S77
186. Thompson, B.M., *et al.* Current physical and SDS extraction methods do not efficiently remove exosporium proteins from *Bacillus anthracis* spores. *J Microbiol Methods* 85, 143-148
187. Roitt, I., *et al.* (1997) Introducción al sistema inmunitario. In *Inmunología*, p. 1.1-1.12, Times Mirror International Publishers Limited, 4th edition en español
188. Bell, E. (2006) Antibodies: IgG effector function: a question of balance. *Nature Reviews: Immunology* 6, p. 1
189. Jefferis, R. (2006) Criteria for Selection of IgG Isotype and Glycoform of Antibody Therapeutics. *BioProcess International*, p. 40-43
190. Jefferis, R., *et al.* (1998) IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev* 163, 59-76
191. Wu, F.Q. Detection and quantification of *Legionella pneumophila* using quantitative polymerase chain reaction (QPCR). In *Aemtek Report Supporting Document, Legionella QPCR, v. 3, Page 3 of 4*, p. 3, Aemtek, Inc.
192. Cloud, J.L., *et al.* (2000) Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* 38, 1709-1712
193. Weiss, A. (1999) Concurrent engineering for lateral-flow diagnostics. *IVD Technology* November
194. Pearcey, T.E. (2000) Lyophilization processing: Freeze-dried microspheres offer new IVD packaging and product opportunities. *IVD Technology* May
195. Jennings, T.A. (1997) Effect of formulation on lyophilization, part 1. *IVD Technology* January
196. Jennings, T.A. (1997) Effect of formulation on lyophilization, part 2. *IVD Technology* March

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS

ANEXO 1

Tabla ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS ANEXO1.1. Reactivos usados en el proceso de fusión

ABREVIATURA	TAMPÓN/DISOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
AFC	Adyuvante de Freund completo	Emulsión de aceite-agua con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> muertos
AFI	Adyuvante de Freund incompleto	Emulsión de aceite-agua
Am	Aminopterina 0.04 mM (100x)	Aminopterina 0.0176 mg/ml
DMEM suplementado	Dulbecco's Modified Eagle's Medium en polvo (Gibco [®] , Life Technologies [™] Corporation, USA) con L-glutamina, 4.5 g/l de glucosa, sin piruvato sódico, sin Na ₂ CO ₃ . Con NaHCO ₃ , con β-mercaptoetanol (25 μl/10 l, pH 7.2)	CaCl ₂ 0.2 g/l, Fe(HNO ₃) ₃ 0.1 mg/l, KCl 0.4 g/l, MgSO ₄ 97.67 mg/l, NaCl 6.4 g/l, NaHCO ₃ 3.7 g/l, Na ₃ PO ₄ 0.125 g/l, D-glucosa 4.5 g/l, Rojo Fenol 15 mg/l, Piruvato sódico 0.11 g/l, L-Arginina-HCl 84 mg/ml, L-Cisteina-2HCl 63 mg/ml, L-Histidina-HCl-H ₂ O 42 mg/ml, L-Isoleucina y L-Leucina 0.105 g/l, L-Lisina-HCl 0.146 g/l, L-Metionina 30 mg/l, L-Fenilalanina 66 mg/ml, L-Serina 42 mg/l, L-Treonina 95 mg/ml, L-Triptófano 16 mg/ml, L-Tirosina 2Na ₂ H ₂ O 0.104 g/l, L-Valina 94 mg/l, D-Ca Pantoténico, Acido Fólico y Cloruro de Colina 4 mg/ml, I-Inositol 7.2 mg/ml, Niaciamida, Piridoxina-HCl y Tiamina-HCl 4 mg/ml y Riboflavina 0.4 mg/ml, pH 7.2
HT	Hipoxantina 10 mM + Timidina 1.6 mM (100x)	Hipoxantina 1.36 mg/ml, Timidina 0.38 mg/ml
P4000	Polietilenglicol (PEG) 4000 al 71 % (p/v)	0.714 g PEG 4000/ml de DMEM suplementado
SFB	Suero Fetal Bovino	GIBCO [®] Life Technologies [™] , USA
TC 0.1M pH 8.9	Tampón Carbonato 0.1M pH 8.9	Na ₂ CO ₃ 10.6 g/l, pH 8.9

FUSIÓN (Departamento de Inmunología, Vircell, S.L.)

(Ver tabla ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS ANEXO1.1 para las abreviaturas de los reactivos). Para ello se usó el kit ClonaCell[®]-HY Hybridoma Cloning Kit

(http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/9/3/F/0/1/28411_MAN_2_2_0.pdf).

1) Inmunización de ratones: se comenzó unas 6-10 semanas antes de la fusión. Para ello, se eligieron del tipo Balb/c. A cada ratón se le inyectó intraperitonealmente 100 µg de antígeno (Ag) (LPPA o LPS-1 en cada caso) en 250 µl de TC 0.1M pH 8.9 con 250 µl de adyuvante de Freund completo (AFC). A las dos semanas se repitió la dosis pero en este caso con adyuvante de Freund incompleto (AFI). El día 35 y el 56 se inyectaron 100 µl de Ag a 10 µg/ml en TC 0.1M pH 8.9. A los dos meses se comenzó la fusión

2) Obtención de suero de ratón: se introdujo la sangre obtenida de los ratones en tubos estériles con una membrana separadora y se incubaron 60 minutos a 37 °C. Se centrifugaron 10 minutos a 10000xg y a 4 °C. El suero así obtenido se retiró con una pipeta, se repartió en viales y se congeló a -20 °C. El siguiente paso fue el análisis de los sueros de ratón por ELISA para conocer la actividad de los mismos y saber si la inmunización había sido correcta.

3) A continuación, se realizó la purificación de esplenocitos de ratón que se localizan en el bazo. Tras el sacrificio e inmovilización de los ratones seleccionados, éstos se empaparon en alcohol de 70° en una cabina de flujo laminar. Tras abrir el abdomen, se limpió el peritoneo con alcohol de 70° y se extrajo el bazo con material estéril. El bazo se lavó con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies™ Corporation, USA) suplementado (ver tabla ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS ANEXO1.1) hasta que cambió a color blanquecino. Con la ayuda de una jeringa se recogió el medio de lavado donde se encontraban los esplenocitos y se llevó a un tubo estéril dejando reposar 5 minutos para comprobar que en el botón no quedasen restos del bazo del ratón. A continuación se centrifugó 5 minutos a 300xg y se resuspendió el pellet en el medio A. Los esplenocitos se cuantificaron tras la lisis de los hematíes con NH₄Cl al 0.9% (p/v) (50 µl esplenocitos con 250 µl NH₄Cl).

4) Preparación de las células mielocíticas: para llevar a cabo la fusión se empleó la línea celular Sp2/0-Ag14 (híbrido entre células de ratones de cepa Balb/c con la línea celular de mieloma P3X63AG8). Las células mielocíticas conservadas en nitrógeno líquido se centrifugaron a 400xg 5 minutos y se resuspendieron en el medio de crecimiento DMEM suplementado con un 15% de suero fetal bovino (SFB) inactivado a 56 °C, a una razón de 5·10⁶ células/50 ml de medio. Posteriormente se almacenaron en frascos estériles a 37 °C en atmósfera de CO₂ para impedir la rotura de las células. Tres días después se repitió el proceso

con las células en el medio de crecimiento, pero pasándolas a un nuevo frasco (frasco 2) con las mismas condiciones. Dos días después los 50 ml del frasco 2 se repartieron en dos frascos nuevos en partes iguales y se completó el volumen de cada uno a 50 ml nuevamente. El día antes de la fusión, los dos frascos se llevaron a un volumen final de 100 ml.

5) Fusión: la fusión consiste en la unión de los esplenocitos del bazo del ratón con las células del mieloma (tumor de las células plasmáticas productoras de anticuerpos) de ratón que se han obtenido. Para ello, los medios se atemperaron a 37 °C. Uno de ellos consistió en una mezcla de 2.4 ml de Polietilenglicol-4000 (P4000) con 0.1 ml de dimetilsulfóxido. Los linfocitos que se cuantificaron, así como el mieloma, se lavaron en el medio A por centrifugación dos veces durante 10 minutos a 400xg. El sobrenadante del mieloma se guardó para posteriormente utilizarse como medio de acondicionado (añadiéndole aminopterina (Am) para 2x). Los pellets de ambos se mezclaron en un frasco estéril y nuevamente con el medio A se lavaron durante 10 minutos a 400xg. A continuación se realizó el paso de fusión propiamente dicho, que es una modificación del método desarrollado por Köhler y Milstein en 1975¹⁷⁰. Se le añadió 1 ml al pellet de P4000 y se agitó durante 1 minuto de forma intensa. Tras otro minuto de reposo, se le añadió 1 ml de DMEM suplementado y se dejó otro minuto sin agitación. Se añadieron 2 ml más de medio (1ml/minuto) y nuevamente se dejó sin agitación durante 2 minutos. A continuación se añadieron 5 ml de DMEM suplementado y se dejó en reposo otros 2 minutos y medio. Se añadieron seguidamente 20 ml del mismo medio pero con 15% de SFB, añadiendo a razón de 5 ml/0.5 minutos agitando suavemente el contenedor. Finalmente se centrifugó durante 5 minutos a 300xg.

6) Sembrado: las células centrifugadas se resuspendieron en el medio de acondicionado con aminopterina a 2x y se añadieron en placas de microtitulación de 96 pocillos a una razón de 100 µl/pocillo, siendo el número de células $1.2 \cdot 10^5$ por pocillo. A cada pocillo se añadió 100 µl de DMEM suplementado con 15% de SFB con una mezcla de hipoxantina y timidina (HT) 2x, de forma que ésta mezcla y la aminopterina quedaron a 1x. Las placas obtenidas se taparon y se guardaron a 37 °C y atmósfera de CO₂.

Se puso como control una siembra de células de mieloma en un medio similar en el que se hicieron los hibridomas. Tras 72 horas de la fusión se retiraron 100 µl/pocillo y se le añadió a cada uno DMEM suplementado con 15 % SFB enriquecido con 1x de HT fresco. Las poblaciones de clones o células híbridas, deben de aparecer a los 10-14 días, observándose un

color anaranjado en los pocillos en los que hay crecimiento celular. Una vez finalizado el proceso de fusión habría tres tipos de células en el cultivo: células mielomatosas, células esplénicas y células híbridas. Las células que mejor crecen “in vitro” son las mielomatosas, y pueden eliminar por sobrecrecimiento a las híbridas. Por este motivo se ha usado en el medio de cultivo hipoxantina, timidina y aminopterina, ya que permiten la supervivencia de las híbridas y elimina selectivamente las células mielomatosas (las células normales pueden sintetizar ADN de dos formas: mediante la síntesis de novo o a partir de bases preformadas que se encuentran en el medio de crecimiento. La aminopterina inhibe al enzima dihidrofolato reductasa por lo que se bloquea la síntesis de novo de las purinas y de las pirimidinas. En estas condiciones la célula se torna dependiente de las fuentes exógenas de purinas y pirimidinas. Las células sp2/0-Ag14 son resistentes a la 8-azaguanina, que es lo mismo que decir que no poseen la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). Por lo tanto, al bloquear la síntesis de novo y al carecer de esta enzima, estas células no podrían sintetizar ADN y morirían en el cultivo. Por otro lado, las células esplénicas en ausencia de estímulo morirían ya que no son capaces de mantenerse viables “in vitro” y las únicas que sobrevivirían serían las células híbridas, ya que poseen la enzima HGPRT procedente del genoma de la célula esplénica y podrían crecer indefinidamente gracias al genoma del componente mielomatoso).

El siguiente paso es el análisis por la técnica de ELISA de los pocillos que contenían los híbridos productores del anticuerpo monoclonal deseado, ya que es preciso aislarlos de los otros híbridos vecinos no productores, ya que estos últimos por sobrecrecimiento podrían anular al clon de interés.

7) Clonación: Se llevó a cabo por dilución resembrando las células de cada pocillo productor de anticuerpos desde 1x a 1/16, de forma que en alguno de los pocillos resembrados apareciesen clones aislados productores de anticuerpos. El proceso de clonación se repitió hasta obtener una población de clones puros (células en proporciones cercanas a 1 célula por pocillo).

8) Crecimiento: una vez se estableció el crecimiento de un clon híbrido productor del anticuerpo monoclonal deseado, se promovió el crecimiento de este hibridoma a gran escala. Para ello se realizó un crecimiento estacionario en frascos de plástico. Las células híbridas se mantuvieron en DMEM suplementado con 5% de SFB a una temperatura de 37 °C y

atmósfera de CO₂ y tras 4-6 días el sobrenadante se recogió. En él se encuentra el Mab listo para purificar. El rendimiento suele ser de 0.1 a 10 µg por ml.

Los hibridomas obtenidos se denominaron con letras: A, B, C, D, etc. y correspondían a las placas como sigue: LPPA A (2C4C32C6), LPPA B(1D9E32D2), LPPA C (3E9E71E11), LPPA D (2F4E9), LPPA E (5C7D52F10), LPPA F (3F10D52F62E4), LPS-1 A (4C6E1F2), LPS-1 B (5F5G8), LPS-1 C (2D2F6), LPS-1 D (2B7A1A4), LPS-1 E (4B10G6), LPS-1 F (4G7F2), LPS-1 G (3A2E3), LPS-1 H (4E10E6) y LPS-1 I (5B12E2).

Para estudiar la funcionalidad de los sobrenadantes de cultivos de hibridomas se usó la técnica de ELISA. Se analizaron los sobrenadantes directos y el criterio de positividad fue en base a la media de las absorbancias de los controles negativos más tres veces su desviación estándar. Se seleccionaron aquellos clones que fueron interesantes para un posterior uso y se estudió el isotipo de dichos Mab.

ANEXO 2

ISOTIPAJE DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (Departamento de Inmunología, Vircell, S.L.)

El isotipaje de Mab de ratón se llevó a cabo para determinar la subclase o isotipo de forma cualitativa y favorecer una posterior purificación así como su modo de empleo. Los Mab procedentes de los sobrenadantes de cultivo de células hibridadas pueden ser identificados mediante inmunodifusión o ELISA.

En este caso fue llevado a cabo mediante un kit de ELISA: Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma-Aldrich). El kit se compone de IgG de cabra anti-ratón IgG1, IgG de cabra anti-ratón IgG2a, IgG de cabra anti-ratón IgG2b, IgG de cabra anti-ratón IgG3, IgG de cabra anti-ratón IgM e IgG de cabra anti-ratón IgA.

El procedimiento (ELISA de captura) se realizó según las instrucciones del fabricante y preparando y obteniendo el resto de reactivos no incluidos pero necesarios (consultar página web del fabricante para ver el procedimiento: (<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/iso2bul.Par.0001.File.tmp/iso2bul.pdf>)). El protocolo realizado fue:

9. ANEXOS

- 1) Los anticuerpos específicos de isotipo fueron diluidos a 1:1000 en tampón fosfato 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4 (PBS) y se depositaron 100 µl por cada pocillo.
- 2) Se incubó 1 h a 37 °C.
- 3) Se lavó tres veces con tampón de lavado (PBS con 0.05 % de Tween[®] 20).
- 4) Se añadió al pocillo correspondiente 100 µl de sobrenadante a examinar y se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
- 5) Se repitió el paso 3.
- 6) Se añadieron 100 µl de IgG de cabra anti-IgG de ratón (Fab específico) diluido a 1:600 en PBS.
- 7) Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.
- 8) Se repitió el paso 3.
- 9) Se preparó el sustrato: se disolvió ácido 5-aminosalicílico a 1mg/ml en tampón de sustrato (0.02 M fosfato sódico pH 6.8) y se preparó una solución fresca de H₂O₂ al 1% (v/v) en agua destilada. A la solución de ácido 5-aminosalicílico preparada se le añadió 0.1 ml de la solución de H₂O₂ al 1%.
- 10) Se añadieron 100 µl del sustrato preparado y se incubó 20-30 minutos a temperatura ambiente, siendo el resultado positivo color marrón en el pocillo.
- 11) Se paró la reacción con 50 µl de NaOH 3 N.
- 12) Se realizó la lectura a una absorbancia de 450 nm.

El resultado obtenido fue el que se muestra en la tabla ANEXO RESULTADOS ANEXO 2.1. del ANEXO 2 del ANEXO RESULTADOS.

ANEXO 3

CRECIMIENTO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (Departamento de Inmunología, Vircell, S.L.)

Una vez que se ha conseguido establecer el crecimiento de la clona híbrida productora del anticuerpo monoclonal deseado, se debe promover el crecimiento de este hibridoma a gran escala. Para realizarlo se ha llevado a cabo “In vitro”.

Se produce el crecimiento estacionario en frascos de plástico o Roller. Para ello las células híbridas son mantenidas en DMEM suplementado con 5 % de SFB, a una temperatura de 37 °C y atmósfera de CO₂, y transcurridos 4-6 días el sobrenadante es recogido. En este se

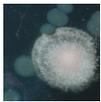
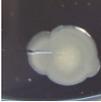
encontrará el anticuerpo monoclonal listo para purificar. El crecimiento del hibridoma “in vitro” produce de 0.1 a 10 μg por ml.

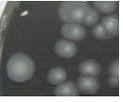
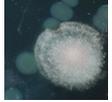
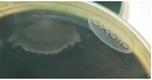
9.2. ANEXO RESULTADOS

ANEXO 1

Se muestra la descripción de las colonias de las placas inoculadas a partir de las muestras del Grupo II y las fotos de dichas placas (apartado 5.1. de Resultados).

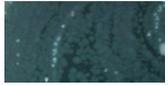
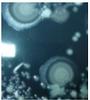
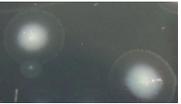
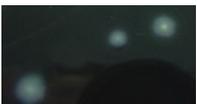
Tabla ANEXO RESULTADOS ANEXO 1.1. Descripción de las colonias de las placas del grupo II

	1605.3 A: redonda, amarillenta, bordes flor, rugosa, punto central, 1-1,5 cm.
	1605.3 B: lisa, amarillenta, redonda perfecta, anillos en el centro, 0,9-1 cm.
	1605.3 C: amarillenta, redonda perfecta, punto central, abombada, centro oscuro, 3-4 mm.
	1605.3 D: blanquecina, redonda perfecta, lisa, 1 mm.
	1727.1 S1 aislamiento: blanca, redonda.
	1728.1 spp A: blanca y amarillenta en centro, punto central, lisa con surcos, borde irregular y en relieve, 1-1.3 cm.
	1728.1 spp B grande y pequeña: blanca, punto interior con halo más claro, redondeada, 1-2 y 2-3 mm.

	1800.8 A: redonda no perfecta, blanca brillante, punto central amarillento con gránulos en relieve, 4-6 mm.
	1800.8 B: redonda, blanca, punto central amarillento, 2-3 mm.
	1864.1 A: blanca, redonda, borde blanco en relieve, rugosa, punto central y halo más claro alrededor seguido de zona más intensa en el borde, 7-8 mm.
	1864.1 B: blanca, punto central, redonda, lisa, borde fino y en relieve, 4-6 mm.
	1920.2 A: forma de triángulo con bordes redondeados, blanca, puntos centrales, reseca, mate, 1-1.2 cm.
	1920.2 B: redonda, blanca, punto central exterior rugoso, borde en depresión, centro liso, 5 mm.
	1643.1 A: redonda, bordes irregulares, rosa en el centro y verdosa, peluda, borde blanco, 1-2 cm.
	1643.1 B: amarillenta, lisa, redonda, brillante, lechosa, 2-5 mm.
	1643.1 C: amarillenta, redonda, punto central y borde blancos, 2-3 mm.
	1643.1 D: blanquecina, poco rellena, borde blanco y más oscuro y de forma irregular, plana y punteada (surcos), 2-3 cm.

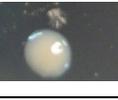
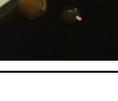
9. ANEXOS

	1866.1 A: blanca, peluda, abombada, rugosa, bordes irregulares, redonda, 2-3 mm.
	1866.1 B: redonda, blanquecina, 1-2 mm.
	1866.1 C: peluda, blanquecina, abombada, 2-3 mm.
	1866.1 D: forma masa, blanquecina, redonda, lisa, < 1 mm.
	1867.1 A: blanquecina, lisa, redonda, centro más oscuro, abombada, 4-5 mm.
	1867.1 B: redonda, pequeña, blanquecina, lisa, < 1 mm.
	1867.1 C: redonda, surco en el interior, lisa, blanquecina, 4-5 mm.
	1866.2 A: redonda, amarillenta, hueco central, rugosa, 4-5 mm.
	1866.2 B: blanca amarillenta, redonda, lisa, abombada, 1-2 mm.
	1866.2 C: forma masa, blanca amarillenta, redonda, lisa, < 1 mm.

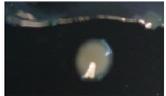
	1788.2 A: redonda, blanquecina, puntos centrales pequeños, abombada, lisa y alrededor puntos, 2-3 mm.
	1788.2 B: redonda, blanca, lisa, < 1 mm.
	1788.2 C: blanca oscura, plana, forma masa, 1-2 mm.
	1419.1 S2_14: redonda, blanquecina, rugosa, punto central más relleno, 3-4 mm.
	1865.1 A: redonda con anillos intercalando más oscuro y más claro. Los anillos más oscuros en relieve, 0.5-1 cm.
	1865.1 B: blanca, pequeña, redonda, lisa, parte central más blanca que alrededor, 1-3 mm.
	1865.1 C: forma masa, blanquecina, redonda, lisa, 1-2 mm.
	1878.9: blanquecina, redonda, lisa, centro más oscuro, 2-3 mm.
	1785.1 A: redonda, blanca interior con punto blanco en el centro y halo alrededor casi invisible, rugosa, 7-8 mm.
	1785.1 B: pequeña, redonda, punto central resaltado (relieve), halo alrededor, borde más ancho que punto central, 1-3 mm.

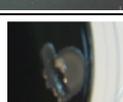
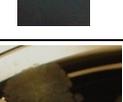
9. ANEXOS

	1971.12 A: redonda, rosa, mate, lisa, abombada, 4-5 mm.
	1971.12 B: fondo, incoloro, redondo y alargado, < 1 mm.
	1760.1 A: blanca, peluda, centro en relieve, 6-8 mm.
	1760.1 B: rosa, redonda, mate, abombada, 1-2 mm.
	1760.1 C: blanquecina, interior más oscuro (aspecto de clara de huevo no cuajada), borde exterior más blanco, lisa y centro abombado, 5-6 mm.
	1760.1 D: fondo, incoloro, alargado y redondo, < 1 mm.
	1789.2 A: redonda perfecta, lisa, punto central más oscuro, blanquecina, < 1 cm.
	1789.2 B: redonda, centro amarillento con puntos y en relieve respecto al resto, lisa alrededor del centro, 1-1.5 cm.
	1760.3 A: amarillenta verdosa, redonda, borde exterior en relieve seguido de anillo en depresión y centro en relieve y liso, 8-9 mm.
	1760.3 B: fondo, fino, incoloro, < 1 mm.

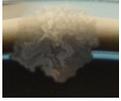
	172? A: peluda, amarillenta, semicírculo, 4-5 cm.
	172? B: marrón, peluda, semicírculo, 2-3 cm.
	172? C: blanca, aspecto seco, quebradiza, redonda con puntas irregulares, 1-1.5 cm.
	172? D: redonda, amarillenta, parte central más oscura, lisa, 2-4 mm.
	172? E: redonda, punto central y filamentos salientes (parece flor de diente de león), 1-2 cm.
	1762.4 A: rosa, redonda perfecta, punto central elevado, mate, lisa, 3-4 mm.
	1762.4 B: incoloro, alargada, estrecha, < 1 mm.
	1729.2 A: peluda, marrón en el exterior y amarilla en el interior, redonda, 2-3 cm.
	1729.2 B: peluda, blanca, redonda rodeada de parte más plana, 2-3 mm.
	1729.2 C: amarillenta, redonda, crece en los bordes, lisa, 1-2 mm.

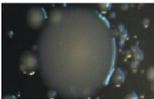
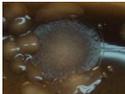
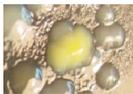
9. ANEXOS

	1420.3 S2_14: blanquecina, redonda, rugosa, punto central más relleno, 3-4 mm.
	1865.2 A: blanquecina, borde en relieve respecto al centro, centro punteado, bordes de flor, 2-4 mm.
	1865.2 B: fondo, redonda, incolora, blanca con gránulos, < 1 mm.
	1455.3 A: blanca, puntos centrales en masa transparente, borde liso y blanco, 2-3 mm.
	1455.3 B: redonda, fondo, blanco y transparente, < 1 mm.
	2070.3 spp A: marrón y amarilla en el centro, peluda, 3-4 cm.
	2070.3 spp B: peluda, blanca (como flor de diente de león), redonda, 2-3 cm.
	2070.3 spp C: redonda perfecta, lisa, blanca y amarillenta, borde más claro, 1-3 mm.
	2069.1 S1: ovalada, blanquecina, lisa, bordes de flor, 1-1.2 cm.
	1868.1: blanca, redonda, abombada y lisa, 1 mm.

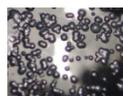
	1849.2 A: blanca y amarillenta, ovalada irregular, interior con puntos más amarillentos, borde liso en relieve, 1-2 cm.
	1849.2 B: alargado, incoloro, < 1 mm.
	1171.17 A. rosa, redonda, mate, lisa, abombada, 2-4 cm.
	1171.17 B: incoloro, alargado, forma fondo, < 1 mm.
	1889.7 A: blanca y amarillenta, redonda, lisa, 1-2 cm.
	1889.7 B: fondo, incoloro, alargado, < 1 mm.
	1920.1 A: redonda, centro en relieve con anillo y halo punteado, borde en puntas y nervios, centro amarillo y blanco, 0.5-1 cm.
	1920.1 B: blanca en relieve, forma amorfa (como granos de sal), 1 mm.
	1920.1 C: redonda, lisa, blanca, 2-3 mm.
	1920.1 D: aspecto seco, quebradiza, circulo deformado con puntas, en el centro puntos blancos, 0.5-1 cm.

9. ANEXOS

	2069.2 S1 A: blanca con anillos, punto blanco en el centro con dos circunferencias y borde en relieve, 1-2 cm.
	2069.2 S1 B: incoloro, alargado, fino.
	1486.1 A: redonda y blanca, centro relleno con puntos en relieve más amarillos, centro más claro y borde más oscuro en relieve, 3-8 mm.
	1486.1 B: redonda, lisa, blanquecina, borde más claro en depresión, 2-3 mm.
	1486.1 C: blanca, redonda, punto blanco central, con líneas hacia el exterior como nervios, 4-5 mm.
	1516.4 A: blanca, plana, redonda, centro en depresión, 1-2 mm.
	1516.4 B: blanca, redonda, lisa, < 1 mm.
	1728.6 A: redonda, amarillenta, centro rojizo, lisa, abombada, 1-3 cm.
	1728.6 B: blanca, redonda, lisa, abombada, 1 mm.
	1728.6 C: blanca, seca, forma irregular, centro más intenso, quebradiza, 5 mm.

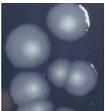
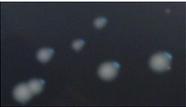
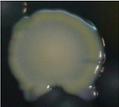
	1727.4: redonda con bordes en flor, borde en depresión (plano) respecto al resto, blanca y transparente, puntos en relieve, centro en relieve rodeado de depresión que se separa del resto, punto gordo en el centro, 1-3 cm.
	1757.1 TT A: redonda, lisa, blanquecina, interior más amarillento y más intenso, lisa, 1.1 cm.
	1757.1 TT B: redonda, lisa, blanca, pequeña, punto central más intenso, 1-3 mm.
	1757.1 TT C: peluda, blanca, centro más relleno, redonda, 0.3-0.4 cm.
	1907.3 6u/c A: blanca, redonda, lisa, brillante (aspecto mojado), 1-3 mm.
	1907.3 6u/c B: blanco, cuarteada, brillo metálico, interior con borde, 1-2 mm.
	1455.1 pH 8: blanca, redonda, centro en relieve blanco punteado con borde blanco, 2-3 mm.
	1727.3 A: blanca y rosada, peluda, punto central oscuro, redonda, 1-2 cm.
	1727.3 B: blanca, peluda y carnosa, ovalada, bordes irregulares, 2 cm.
	1727.3 C: amarilla verdosa, ovalada, abombada, lisa, 2 mm.

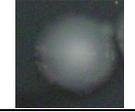
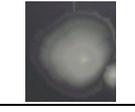
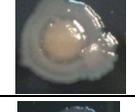
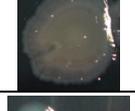
9. ANEXOS

	1727.3 D: redonda, centro amarillo punteado con borde blanco, 2-3 mm.
	1727.3 E: redonda, blanca, lisa, abombada, 1-3 mm.
	1419.3 S2_14+otras A: blanquecina, redonda, lisa, punto central blanco, 1-3 mm.
	1419.3 S2_14+otras B: blanquecina, redonda, forma masa, < 1 mm.
	1867.2 A: redonda, punto central oscuro con zona clara y borde irregular, 0.5-1 cm.
	1867.2 B: redonda, hueco central, blanquecina, 1 cm.
	1867.2 C: redonda, pequeña, lisa, blanca, 1 mm.
	1849.1 A: verde en interior y blanca en el exterior, pelusa, verde en relieve, 1-2 cm.
	1849.1 B: punto central blanco con zona clara y zona blanca y borde relieve, 1-2 cm.
	1849.1 C: redonda, lisa, blanquecina, 1 cm.

	1849.1 D: blanca, redonda, lisa, abombada, brillante (aspecto mojado), 2-3 mm.
	2871.3 aislamiento: blanca, forma de C doblada, lechosa, brillante, lisa, 1 cm.
	2161.3 0.1: blanca, lechosa, punto central, borde liso, redonda, brillante, 3-6 mm.
	2739.1: blanca-amarillenta, redonda, punto central blanco, lisa, borde en relieve, brillo, 2-3 mm.
	2766.1: punto central blanco, borde ancho blanquecino rugoso, brillo, 0.8-1 cm.
	2871.3 aislamiento: blanca, redonda, lisa, brillante, 1-3 mm.
	3187.1: punto blanco central, halo rugoso, redonda, 1-2 cm.
	3469.3: punto central abombado blanco con zona verdosa y borde blanco, lisa, redonda, 0.5-1 cm.
	2739.2: blanca, lisa, redonda, punto central, borde en relieve, 2-4 mm.
	2870.2 aislamiento: blanca, redonda, lisa, punto central, 1-2 mm.

9. ANEXOS

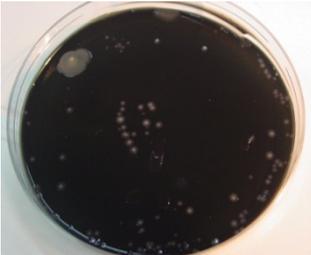
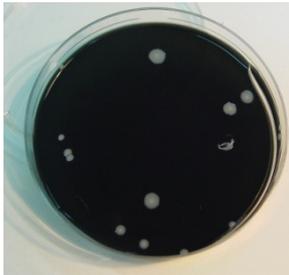
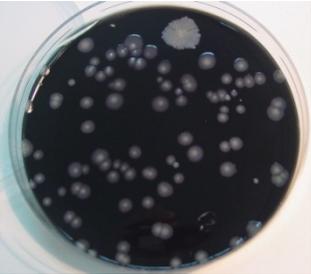
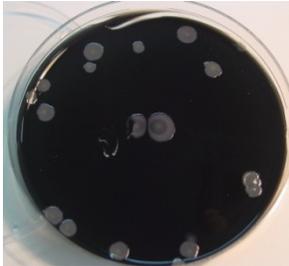
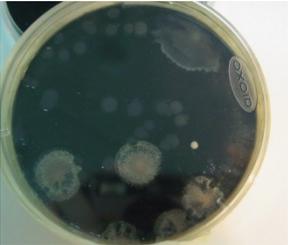
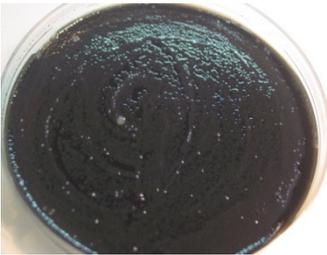
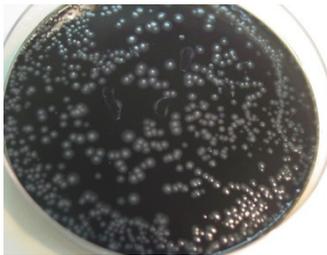
	2925.2: blanca, redonda, punto central y borde claro, redonda, lisa, brillante, 4-7 mm.
	2739.4: blanca, redonda, lisa, brillante, 2-3 mm.
	3468.2: punto central abombado blanco con zona verdosa y borde blanco, lisa, redonda, 0.5-1 cm.
	2337.1: blanca, redonda, punto central blanco gordo con halo transparente, brillante, 2-5 mm.
	3469.1 A: blanca, redonda, irregular, 3-4 mm-
	3469.1 B: blanca, redonda, lisa, punto central y halo, 1-2 mm.
	3156.2 A: punto central blanco con halo, grande, 1-2 cm.
	3156.2 B: blanca, pequeña, redonda, lisa, 1-2 mm.
	2738.1 A: blanca intensa, redonda, borde de huevo frito, 5-6 mm.
	2738.1 B: amarillenta-marrón, lisa, redonda, 5-7 mm.

	2738.1 C: amarilla, gránulos, bordes en forma de flor, 0.8-1 cm.
	2738.1 D: blanca, redonda, punto blanco central, halo, 3-5 mm.
	2925.1 A: redonda con anillos, amarillenta, 2-3 cm.
	2925.1 B: blanca, punto central, halo, redonda, 0.6-1 cm.
	3140.1 A: redonda irregular con anillos, blanca, halo, 1-2 cm.
	3140.1 B: redonda, blanca, anillos, lisa, 6-7 mm.
	3129.1 PVP A: marrón-dorada, centro con halo claro, forma de flor, punto central, 6-7 mm.
	3129.1 PVP B: amarillenta-marrón, no punto central, borde, 1 cm.
	3129.1 PVP C: blanca, lisa, redonda, 2-3 mm.
	2768.2 A: blanca, punto central con halo claro, redonda, brillante, 3-5 mm.

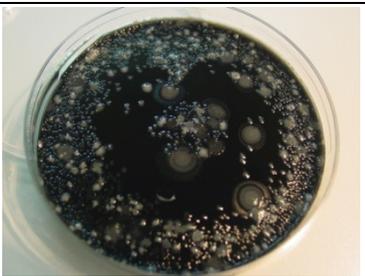
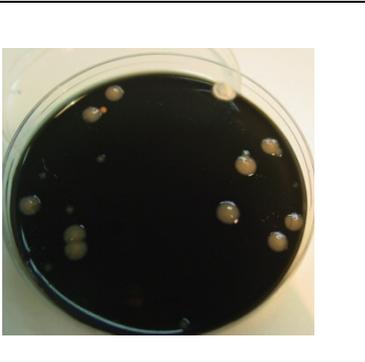
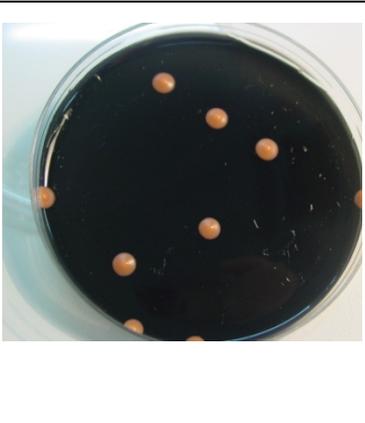
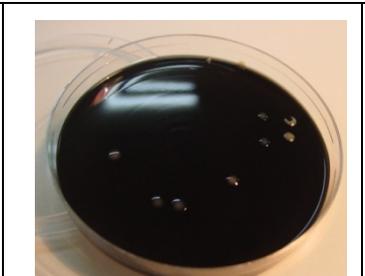
9. ANEXOS

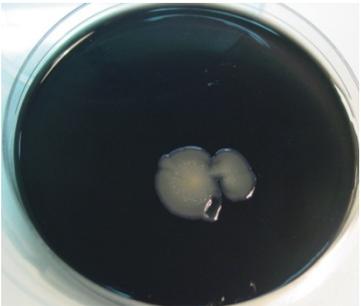
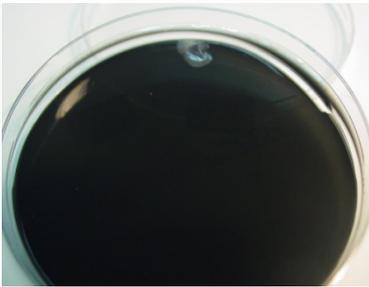
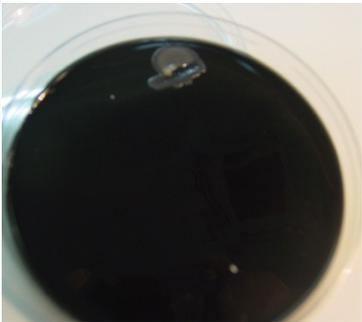
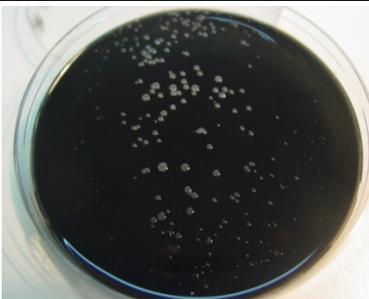
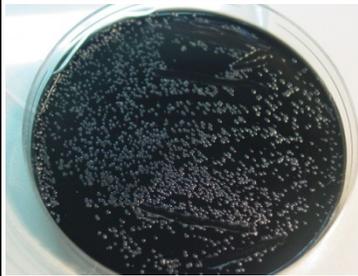
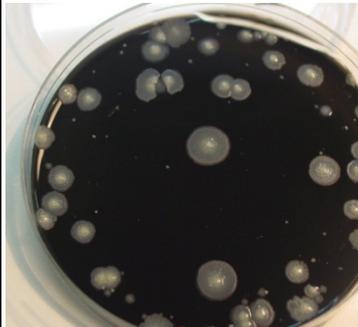
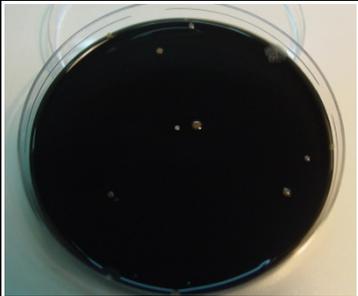
	2768.2 B: redonda, mate, anillo exterior e interior hueco, aspecto metálico, dorada, 2-5 mm.
	2768.2 C: blanca, pequeña, irregular, bordes estrellados, 3 mm.
	2768.2 D: amarillenta, redonda, lisa, pequeña, 1-2 mm.

Figura ANEXO RESULTADOS ANEXO 1.1. Placas inoculadas a partir de muestras ambientales (aguas del Grupo II) de SGS Tecnos, S.A. Laboratorio de Microbiología de Medio Ambiente y Prevención (Madrid, España).

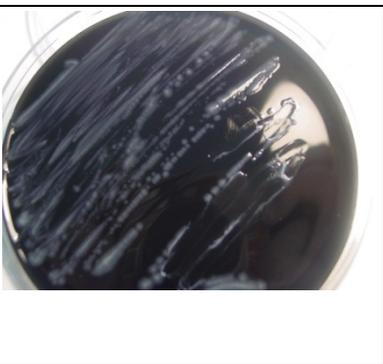
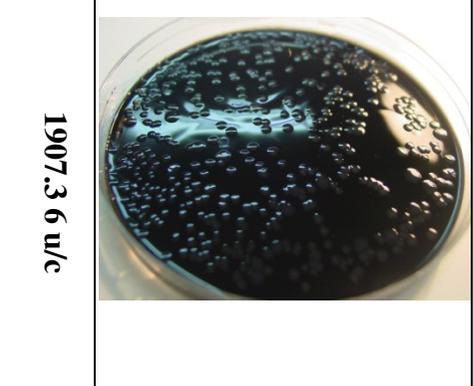
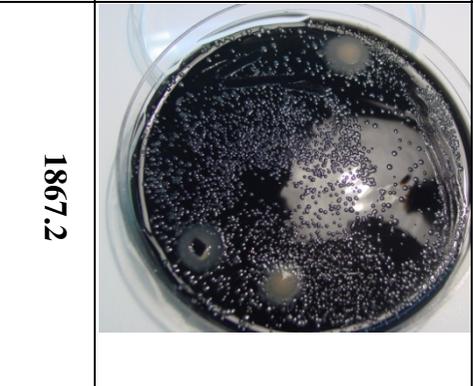
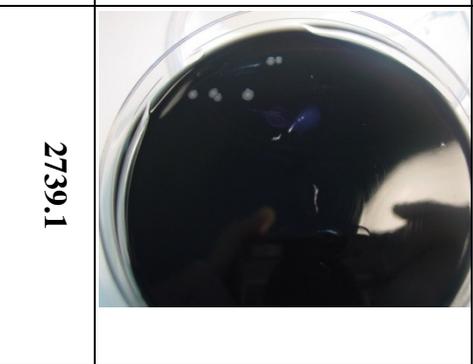
 <p>1605.3</p>	 <p>1727.1S1 aislamiento</p>	 <p>1728.1 spp</p>	 <p>1800.8</p>
 <p>1864.1</p>	 <p>1920.2</p>	 <p>1643.1</p>	 <p>1866.1</p>
 <p>1867.1</p>	 <p>1866.2</p>	 <p>1788.2</p>	 <p>1419.1 S2_14</p>

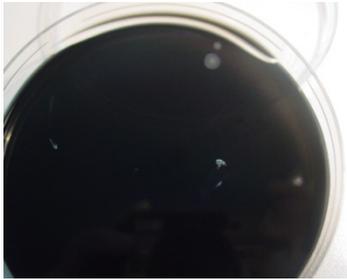
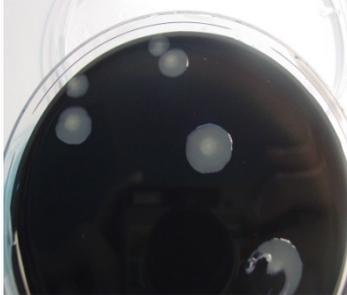
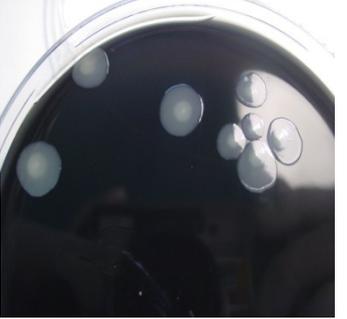
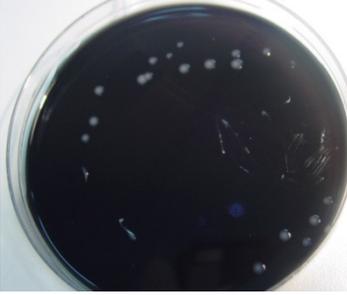
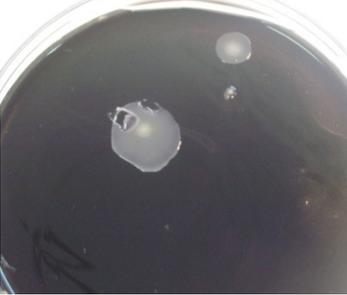
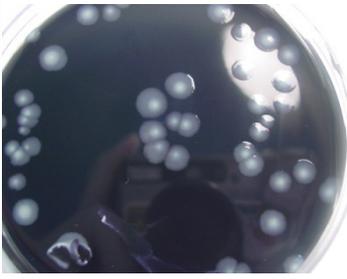
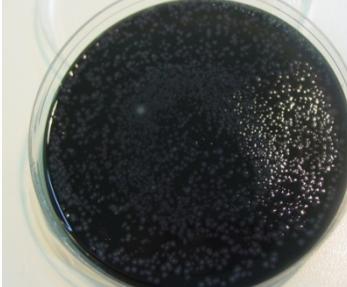
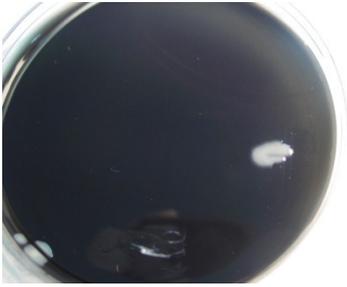
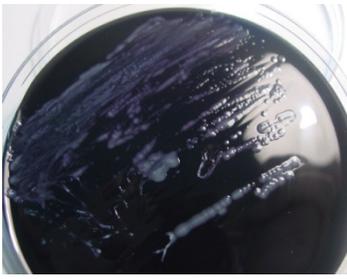
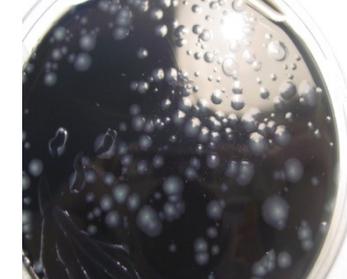
9. ANEXOS

 <p data-bbox="226 325 259 416">1865.1</p>	 <p data-bbox="226 687 259 778">1760.1</p>	 <p data-bbox="226 1082 259 1173">1762.4</p>
 <p data-bbox="703 325 736 416">1878.9</p>	 <p data-bbox="703 687 736 778">1789.2</p>	 <p data-bbox="703 1082 736 1173">1729.2</p>
 <p data-bbox="1158 325 1191 416">1785.1</p>	 <p data-bbox="1158 687 1191 778">1760.3</p>	 <p data-bbox="1158 1034 1191 1220">1420.3 S2_14</p>
 <p data-bbox="1635 325 1668 416">1971.12</p>	 <p data-bbox="1635 687 1668 778">172?</p>	 <p data-bbox="1635 1082 1668 1173">1865.2</p>

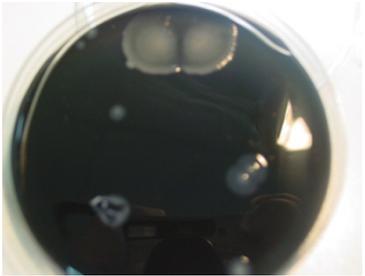
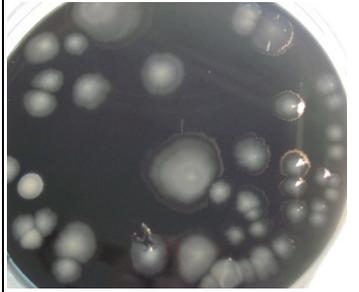
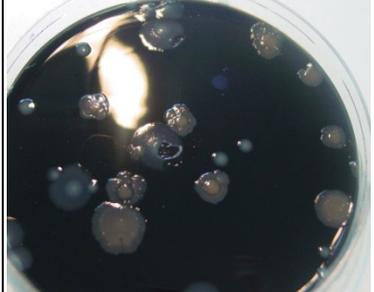
		
		
		
		

9. ANEXOS

 <p>1727.4</p>	 <p>1727.3</p>	 <p>2871.3 aislamiento</p>
<p>1757.1 TT</p>	<p>1429.3 S2_14 + OTRAS</p>	<p>21621.3 0.1</p>
 <p>1907.3 6 w/c</p>	 <p>1867.2</p>	 <p>2739.1</p>
 <p>1455.1 pH 8</p>	 <p>1849.1</p>	 <p>2766.1</p>

9. ANEXOS

	<p>2925.1</p>
	<p>3140.1</p>
	<p>3129.1 PVP</p>
	<p>2768.2</p>

ANEXO 2

Tabla ANEXO RESULTADOS ANEXO 2.1. Isotipo obtenido para cada Mab analizado.

	IgG 1	IgG 2a	IgG 2b	IgG 3	IgM	IgA
LPPA A		+				
LPPA B	+					
LPPA C	+					
LPPA D	+					
LPPA E	+					
LPPA F	+					
LPS-1 A				+		
LPS-1 B	+					
LPS-1 C	+					
LPS-1 D					+	
LPS-1 E				+		
LPS-1 F				+		
LPS-1 G	+					
LPS-1 H			+			
LPS-1 I				+		

ANEXO 3

A continuación se muestran los datos obtenidos con la herramienta Clinical Calculator 1 del sitio web <http://vassarstats.net>.

Línea GÉNERO

VassarStats Printable Report: From an Observed Sample: Estimates of Population Prevalence, Sensitivity, Specificity, Predictive Values, and likelihood Ratios Mon Apr 30 2012 21:07:25 GMT+0200 (Hora de verano romance)). Values entered:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	78	78
Test Negative	133	0	133
Totals	133	78	211

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.369668	0.305167	0.438999
Sensitivity	1	0.941513	1
Specificity	1	0.965013	1
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.369668	0.305167	0.438999
Negative	0.630332	0.561001	0.694833
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive	1	0.941513	1
False Positive	0	0	0.058487
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative	1	0.965013	1
False Negative	0	0	0.034987
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence			
Positive [C]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [C]	0	0	NaN
Positive [W]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [W]	0	0	NaN

Línea SEROGRUPO 1

VassarStats Printable Report: From an Observed Sample: Estimates of Population Prevalence, Sensitivity, Specificity, Predictive Values, and likelihood Ratios Mon Apr 30 2012 21:08:53 GMT+0200 (Hora de verano romance)). Values entered:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	30	30
Test Negative	180	1	181
Totals	180	31	211

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.146919	0.103457	0.203624
Sensitivity	0.967742	0.814895	0.998314
Specificity	1	0.973955	1
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.14218	0.099434	0.198354
Negative	0.85782	0.801646	0.900566
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive	1	0.85868	1
False Positive	0	0	0.14132
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative	0.994475	0.964904	0.999712
False Negative	0.005525	0.000288	0.035096
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence			
Positive [C]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [C]	0.032258	0.004691	0.221818
Positive [W]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [W]	0.005556	0.000787	0.039228

Línea SEROGRUPOS 1 a 15 (ESPECIE)

VassarStats Printable Report: From an Observed Sample: Estimates of Population Prevalence, Sensitivity, Specificity, Predictive Values, and likelihood Ratios Mon Apr 30 2012 21:09:38 GMT+0200 (Hora de verano romance)). Values entered:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	58	58
Test Negative	153	0	153
Totals	153	58	211

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.274882	0.216903	0.341224
Sensitivity	1	0.922613	1
Specificity	1	0.969473	1
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.274882	0.216903	0.341224
Negative	0.725118	0.658776	0.783097
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive	1	0.922613	1
False Positive	0	0	0.077387
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative	1	0.969473	1
False Negative	0	0	0.030527
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence			
Positive [C]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [C]	0	0	NaN
Positive [W]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [W]	0	0	NaN

Test GLOBAL

VassarStats Printable Report: From an Observed Sample: Estimates of Population Prevalence, Sensitivity, Specificity, Predictive Values, and likelihood Ratios Mon Apr 30 2012 21:11:06 GMT+0200 (Hora de verano romance)). Values entered:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	77	77
Test Negative	133	1	134
Totals	133	78	211

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.369668	0.305167	0.438999
Sensitivity	0.987179	0.92086	0.99933
Specificity	1	0.965013	1
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.364929	0.300687	0.434176
Negative	0.635071	0.565824	0.699313
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive	1	0.94079	1
False Positive	0	0	0.05921
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative	0.992537	0.952957	0.99961
False Negative	0.007463	0.00039	0.047043
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence			
Positive [C]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [C]	0.012821	0.001829	0.089873
Positive [W]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [W]	0.007519	0.001067	0.052992

ANEXO 4

A continuación se muestran los datos obtenidos con el programa Medcalc[®] proporcionado por el sitio web <http://www.medcalc.org>:

Línea GÉNERO

Variable	GLOBAL_GÉN GLOBAL GÉN	Sample size	211
Classification variable	REAL_GÉN REAL GÉN	Positive group : REAL GÉN = 1	78
		Negative group : REAL GÉN = 0	133

Area under the ROC curve (AUC)	1,000
Standard Error ^a	0,000
95% Confidence interval ^b	0,983 to 1,000
Significance level P (Area=0.5)	0.000

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

9. ANEXOS

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
>=0	100,00	95,4 - 100,0	0,00	0,0 - 2,7	1,00	
>0 *	100,00	95,4 - 100,0	100,00	97,3 - 100,0		0,00
>1	0,00	0,0 - 4,6	100,00	97,3 - 100,0		1,00

* Criterion corresponding with highest Youden index

Línea SEROGRUPO 1

Variable	GLOBAL_SR1	Sample size	211
Classification variable	REAL_SR1	Positive group : REAL SR1 = 1	31
	REAL SR1	Negative group : REAL SR1 = 0	180

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Area under the ROC curve (AUC)	0,984
Standard Error ^a	0,0161
95% Confidence interval ^b	0,956 to 0,996
z statistic	30,000
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
>=0	100,00	88,8 - 100,0	0,00	0,0 - 2,0	1,00	
>0 *	96,77	83,3 - 99,9	100,00	98,0 - 100,0		0,032
>1	0,00	0,0 - 11,2	100,00	98,0 - 100,0		1,00

* Criterion corresponding with highest Youden index

Línea SEROGRUPOS 1 a 1(ESPECIE)

Variable	GLOBAL_ESP	Sample size	211
Classification variable	REAL_ESP	Positive group : REAL_ESP = 1	58
		Negative group : REAL_ESP = 0	153

Area under the ROC curve (AUC)	1,000
Standard Error ^a	0,000
95% Confidence interval ^b	0,983 to 1,000
Significance level P (Area=0.5)	0,000

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
>=0	100,00	93,8 - 100,0	0,00	0,0 - 2,4	1,00	
>0 *	100,00	93,8 - 100,0	100,00	97,6 - 100,0		0,00
>1	0,00	0,0 - 6,2	100,00	97,6 - 100,0		1,00

* Criterion corresponding with highest Youden index

Test GLOBAL

Variable	GLOBAL_TOTAL	Sample size	211
Classification variable	REAL_TOTAL	Positive group : REAL_TOTAL = 1	78
		Negative group : REAL_TOTAL = 0	133

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Area under the ROC curve (AUC)	0,994
Standard Error ^a	0,00641
95% Confidence interval ^b	0,971 to 1,000
z statistic	77,000
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
>=0	100,00	95,4 - 100,0	0,00	0,0 - 2,7	1,00	
>0 *	98,72	93,1 - 100,0	100,00	97,3 - 100,0		0,013
>1	0,00	0,0 - 4,6	100,00	97,3 - 100,0		1,00

* Criterion corresponding with highest Youden index

