



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Noves aproximacions per a la detecció de microorganismes patògens

Carme Pastells Díez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universitat de Barcelona

Facultat de Química – Departament de Química Orgànica

Programa de doctorat de Química Orgànica

NOVES APROXIMACIONS PER A LA DETECCIÓ DE MICROORGANISMES PATÒGENS

Memòria per optar al Grau de Doctor per la Universitat de Barcelona
presentada per:

Carme Pastells Díez

Director:

Prof. M. Pilar Marco Colás

Professora d'Investigació

Dept. de Nanotecnologia Química i

Biomolecular

Nb4D, IQAC-CSIC

Tutor:

Dr. Ernesto Nicolàs Galindo

Professor Titular

Dept. de Química Orgànica

Facultat de Química

Universitat de Barcelona

Les imatges de la portada han estat extretes de la biblioteca d'imatges dels Centres per al Control i Prevenció de les Malalties dels Estats Units (CDC, *The Centers for Disease Control and Prevention*), lliures de drets.

*Als meus pares i a la Maria,
per ser-hi sempre*

La complexitat de les coses, les coses dintre de les coses, sembla senzillament inesgotable. Vull dir que res no és fàcil, res no és simple.

La felicitat constant és la curiositat.

Alice Munro

Taula de continguts

Agraïments	V
Resum	VII
Acrònims, abreviatures i sigles	IX
1 Introducció: diagnòstic de malalties infeccioses	13
1.1 Problemàtica de les malalties infeccioses.....	15
1.2 Actuals mètodes de diagnòstic: cultiu cel·lular.....	18
1.3 Noves estratègies de diagnòstic	19
1.3.1 Tècniques basades en la detecció del dna	20
1.3.2 Immunoassajos.....	22
1.3.3 Biosensors.....	24
1.3.4 Espectrometria de masses.....	27
1.3.5 Nanobiotecnologia	28
1.4 Publicació I: Biosensors basats en nanopartícules per a la detecció de bacteris patogènics	31
2 Marc d'investigació, objectius i estructura de la tesi	43
2.1 L'autora i el grup d'investigació	45
2.2 Projectes d'investigació	45
2.3 Objectius i estratègia científica.....	46
2.4 Estructura de la tesi doctoral	47
2.5 Visió general del treball experimental realitzat	49
2.5.1 Selecció de l'antigen	49
2.5.2 Obtenció d'anticossos específics.....	49
2.5.3 Establiment d'un assaig immunoquímic.....	50
2.5.4 Anàlisi de mostres.....	50
3 Establiment d'un procediment immunoquímic per a la detecció de <i>Staphylococcus aureus</i> en mostres clíniques	53
3.1 Introducció.....	55
3.1.1 Rellevància de <i>S. aureus</i>	56
3.1.2 Resistència antimicrobiana.....	57
3.1.3 Estructura de la paret bacteriana.....	59

3.1.4	<i>Anticossos contra S. aureus</i>	62
3.1.5	<i>Aproximacions immunoquímiques per al diagnòstic d'infeccions causades per S. aureus</i>	65
3.2	Objectiu i estratègia	67
3.2.1	<i>Selecció de la diana i preparació dels immunoreactius</i>	67
3.2.2	<i>Producció i avaluació dels anticossos específics</i>	68
3.2.3	<i>Desenvolupament i avaluació d'un ELISA en format de microplaca per a la detecció de S. aureus</i>	68
3.2.4	<i>Estudis preliminars per al desenvolupament d'una micromatriu per a la detecció de S. aureus</i>	68
3.3	Resultats i discussió	69
3.3.1	<i>Desenvolupament d'anticossos específics per a la detecció de S. aureus</i>	69
3.3.2	<i>Establiment d'un immunoassaig de tipus elisa per a la determinació de S. aureus</i>	70
3.3.3	<i>Anàlisi de mostres provinents de cultius de S. aureus</i>	70
a	Trencament de la paret bacteriana	71
b	Detecció de les mostres amb un microscopi confocal	74
3.3.4	<i>Anàlisi de mostres de BAL i BAS dopades amb S. aureus</i>	75
3.3.5	<i>Establiment d'un immunoassaig de tipus micromatriu per a la detecció de S. aureus</i>	76
a	Establiment d'una micromatriu de format indirecte competitiu per a la detecció de PG, PSau7 i S. aureus	77
b	Establiment d'una micromatriu en format sandvitx per a la detecció de S. aureus	80
3.4	Publicacions relacionades	83
3.4.1	<i>Publicació II: Compostos i els seus usos com a haptens per a la detecció de Staphylococcus aureus</i>	83
3.4.2	<i>Publicació III: Estratègia immunoquímica basada en els epítops peptídics del peptidoglicà per a la determinació de Staphylococcus aureus</i>	89
3.5	Resum dels resultats del capítol 3	115
3.6	Principals aportacions del treball descrit en aquest capítol	117
3.7	Materials i mètodes	119
4	Establiment d'un procediment immunoquímic per a la detecció de Pseudomonas aeruginosa en mostres clíniques	125
4.1	Introducció.....	127

4.1.1	<i>Rellevància de P. aeruginosa</i>	128
4.1.2	<i>Quorum sensing i producció de pigments</i>	129
4.1.3	<i>Fibrosi quística</i>	135
4.1.4	<i>Anticossos contra P. aeruginosa</i>	136
4.1.5	<i>Aproximacions immunoquímiques per al diagnòstic d'infeccions causades per P. aeruginosa</i>	138
4.1.6	<i>Treballs anteriors per a la determinació de la piocianina</i>	139
4.2	Objectiu i estratègia	141
4.2.1	<i>Selecció de la diana i preparació dels immunoreactius</i>	141
4.2.2	<i>Producció i avaluació dels anticossos específics</i>	142
4.2.3	<i>Desenvolupament i avaluació d'un ELISA en format de microplaca per a la detecció de PYO i 1-OHphz</i>	142
4.3	Resultats i discussió	142
4.3.1	<i>Desenvolupament d'anticossos específics per a la detecció de P. aeruginosa</i>	142
a	Preparació dels haptens a i b	143
b	Preparació de l'haptè c i obtenció dels anticossos corresponents.	148
4.3.2	<i>Establiment d'un immunoassaig de tipus ELISA per a la determinació de 1-OHphz i PYO</i>	149
4.3.3	<i>Quantificació dels pigments PYO i 1-OHphz en corbes de creixement de medis de cultiu de P. aeruginosa</i>	149
4.3.4	<i>Anàlisi de mostres d'esput de pacients infectats per P. aeruginosa</i>	153
4.3.5	<i>Publicació IX: Haptens i conjugats derivats de la piocianina, anticossos contra els mateixos, i mètode immunoquímica per a la detecció d'infeccions provocades per Pseudomonas aeruginosa</i>	158
4.3.6	<i>Publicació X: determinació immunoquímica de piocianina i 1-hidroxifenazina com a potencials biomarcadors d'infecció per Pseudomonas aeruginosa</i>	161
4.4	Resum dels resultats del capítol 4	191
4.5	Principals aportacions del treball descrit en d'aquest capítol 4	193
4.6	Materials i mètodes	195
5	Conclusions	199
5.1	<i>Establiment d'un procediment immunoquímic per a la detecció de Staphylococcus aureus en mostres clíniques</i>	201
5.2	<i>Establiment d'un procediment immunoquímic per a la detecció de Pseudomonas aeruginosa en mostres clíniques</i>	202

5.3	Conclusions generals.....	203
6	Annex I: avaluació de l'ús terapèutic de l'As230 produït contra la 1-OHphz com a potencial inhibidor del <i>quorum sensing</i>	205
6.1	Objectius i estratègia	207
6.2	Resultats i discussió	207
6.2.1	<i>Preparació i caracterització d'un suport sòlid.....</i>	<i>207</i>
6.2.2	<i>Purificació de l'As230 per immunoafinitat.....</i>	<i>208</i>
6.2.3	<i>Avaluació de la citotoxicitat de la 1-hidroxifenazina en cèl·lules mamàries.....</i>	<i>209</i>
6.2.4	<i>Avaluació de la capacitat inhibidora de l'Ab230 en assajos de citotoxicitat en cèl·lules mamàries en presència de 1-OHphz</i>	<i>211</i>
6.3	Materials i mètodes	215
7	Bibliografia	219
8	Índex de taules i figures	235
8.1	Taules	237
8.2	Figures.....	237

Agraïments

En algun moment de la nostra vida, poden arribar a les nostres mans oportunitats d'una bellesa extraordinària en forma i fons, moments que marquen un abans i un després en la nostra existència. La tesi ha estat un procés llarg i contundent, anys en què he crescut al ritme propi, però acompanyada de molta gent. Deixeu-me, doncs, que comenci expressant el meu més sincer agraïment a aquells que han tingut un paper cabdal en aquest camí i han contribuït que aquesta tesi hagi arribat a bon port.

En primer lloc, el meu agraïment va dirigit a tot el grup d'investigació on he realitzat la tesi, l'antic AMRg i actual Nb4D. Un grup amb rigor científic, perseverança i il·lusió, encapçalat per la Prof. M. Pilar Marco. Pilar, gràcies de tot cor per donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral, per dipositar la teva confiança en mi i ajudar-me a arribar fins al final. Estic orgullosa de la feina que hem fet juntes i d'haver crescut científicament al teu costat. Francisco, tu també has marcat aquesta trajectòria. Tenir-te al laboratori era un privilegi. T'admiraré sempre com a científic però també per la teva humanitat igualment remarcable. Suportaves la teva malaltia amb el somriure més franc de tots nosaltres, una lliçó de coratge i superació constant. Roger, Pablo i Núria, pensament racional, energia i dolls d'humor, tres peces clau del grup, gràcies per estar al peu del canó i acollir-me en els moments de desesperació momentània. Companys de laboratori, que n'heu estat molts, gràcies a tots pels moments que hem compartit. M'emporto un record molt especial i molt d'aprenentatge. En particular m'agradaria donar les gràcies a la Glòria, la meva companya de fatigues de principi a fi. Això ho hem començat juntes i ho acabarem juntes! A la Núria, la meva mestra de laboratori i referència. A l'Àlex, per estar sempre disponible i escoltar les meves paranoies científiques fins al final. A la Marta Broto, per admirar-me tant. Saps que és una admiració totalment corresposta. A l'Ana, per totes les *delicatessen* gallegues, el teu català impecable i tantes històries que fan impossible no estimar-te. Duo sintètic, Montse i Dani, gràcies per acollir-me en la meva última època d'escriptura i per la vostra comprensió i sentit de l'humor. Marta Sanmartí, gràcies per la teva amistat sincera. Per últim, vull agrair a totes les entitats financeres que ho han fet possible: la Generalitat de Catalunya per concedir-me la beca FI i més endavant la BE-DGR per a la realització de la meva estada predoctoral, el CIBER-BBN i el MINECO.

Amb l'arribada de la BE-DGR, va venir una injecció d'aire renovador per la possibilitat de realitzar una estada al laboratori del Prof. Kim Janda. Gràcies, Kim, per deixar-me formar part del grup i ensenyar-me una altra manera de fer recerca. Vull agrair també al Vladimir la seva amabilitat per introduir-me al món dels cultius cel·lulars i inculcar-me la seva metodologia clàssica i metòdica de treballar. I al

Daniel, per treballar a quatre mans i encoratjar-me a seguir endavant. Gràcies, també, a tota la resta de companys de Scripps amb qui vaig poder compartir bons moments. Tota aquesta etapa tampoc hauria estat el mateix sense la calorosa acollida a Del Mar. Gràcies a tota la meva *Maui Family*, per la vostra càlida acollida des del primer dia, especialment a la Mari i en Robbie, per tots els bons moments en família; a la Fede, per ser la meva companya de viatge; a l'Ilaria i en Mike, per ser un referent, i la Vika, en Gareth i l'Ewan per ser els millors veïns californians que podria haver somiat. Per últim, però no menys important, David, gràcies per aportar una mica de passió andalusa a tota aquesta aventura *So Cal*. Sense tu no hauria estat el mateix.

I més breu, però igualment intensa, va ser l'experiència a Caltech de dues setmanes al laboratori de la Prof. Dianne Knewman. Gràcies, Dianne, per convidar-me a fer aquesta estada al teu laboratori i fer que les coses fossin tan fàcils. Kyle, gràcies per tot l'esforç a contribuir que els experiments al laboratori funcionessin. Ian, gràcies per la teva hospitalitat i per tots els moments i converses meravelloses que vam poder compartir tant a dins com a fora del laboratori.

A tots els amics d'arreu que durant aquest camí m'han acompanyat: Sílvia, Anna, Mireia, David, Laia, Marta, Kike, Pep, Fede, Edu, Anna B., Albert i Susanna. Les meves químiques, Núria, Bibi, Elo i Júlia, pel suport i comprensió des de dins. Mar, Isabel i Helena, per aportar llum als meus projectes. Fabio, gràcies pel suport tècnic, però sobretot per recolzar-me en els moments difícils. Susana, gràcies per ser la millor companya de sostre que podria trobar. Ester i Neus, princeses, gràcies per ser-hi sempre i fer que Europa estigui tan a prop. Juntes tot és més fàcil.

M'agradaria també agrair a tota la meva família, tiets i cosins, que ja no goseu preguntar per la tesi però que em demostreu constantment l'estima que em teniu. Gràcies a tots i especialment a la cosineta Marta per la seva aportació en la portada. Per últim, vull dedicar aquestes últimes ratlles a les tres persones més importants de la meva vida, les meves tres referències vitals: gràcies mare, pare i Maria. Gràcies a tots tres, pels vostres innumerables consells i els valors que m'heu inculcat, però sobretot gràcies per l'amor que em demostreu diàriament. Les paraules em queden curtes per agrair-vos el que sento per vosaltres. Us estimo.

Com una escala infinita, així és la tesi i la vida, gràcies a tots per caminar al meu costat.

Resum

La present memòria ha estat realitzada al grup de Nanobiotecnologia pel Diagnòstic (*Nanobiotechnology for Diagnostics, Nb4D*) de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC, Barcelona) liderat per la Prof. M.-Pilar Marco Colás. Aquesta tesi s'ha focalitzat en el desenvolupament de noves eines immunoquímiques per al diagnòstic de malalties infeccioses amb l'objectiu d'incrementar l'eficiència dels actuals mètodes de diagnòstic. Concretament, aquesta tesi s'ha centrat en el desenvolupament de tècniques immunoquímiques per a la detecció de *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* en mostres biològiques. L'estratègia ha consistit a seleccionar dianes específiques de cadascun dels microorganismes i, mitjançant el disseny racional d'haptens d'immunització, desenvolupar anticossos policlonals específics. Els anticossos han estat avaluats mitjançant assajos de tipus ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) i posteriorment s'han implementat en immunoassajos ELISA en microplaca o de micromatrius (*microarrays*) fluorescents per a l'anàlisi de mostres biològiques (bacteris en medi de cultiu) i mostres clíniques d'origen respiratori (esput, rentats broncoalveolars i broncoaspirats). Els immunoassajos obtinguts per ambdós bacteris són capaços de detectar les dianes seleccionades amb nivells de detecció útils per a la seva implementació en l'àmbit de diagnòstic, oferint una alternativa prometedora al diagnòstic de malalties causades per aquests bacteris.

Com a resultat de la investigació realitzada, s'han generat dues patents (PCT/ES2014/070161 i P201530780), les quals es troben en fase de negociació amb empreses de l'àmbit del diagnòstic. A més s'ha publicat un article de revisió que descriu l'estat de la qüestió pel que fa al potencial de la nanobiotecnologia en el diagnòstic de microorganismes patògen, un article de recerca original, que ja ha estat publicat en la revista *Analytica Chimica Acta* i que descriu el treball realitzat pel que fa a la detecció immunoquímica de *S. aureus*, i un tercer article que es troba sota avaluació pels revisors i editors de la revista *Analytical Chemistry* i que reporta la recerca realitzada pel que fa al desenvolupament d'eines immunoquímiques per al diagnòstic de malalties causades per *P. aeruginosa*. Per aquest motiu, la tesi s'ha estructurat en format de compendi de publicacions.

La tesi també inclou un annex fruit d'una estada predoctoral al grup del Prof. Kim Janda de *The Scripps Research Institute* (TSRI, CA, EEUU). L'objectiu de l'estada era l'avaluació com a eines terapèutiques dels anticossos produïts en aquesta tesi contra la *P. aeruginosa*. En aquest sentit, es pretenia investigar el potencial dels anticossos generats per neutralitzar els efectes citotòxics causats per factors de virulència d'aquest microorganisme sobre línies cel·lulars de macròfags. Tot i

l'interès d'aquests estudis, aquest treball no es va poder concloure, i no es descarta reprendre'l més endavant.

A continuació es llisten les publicacions que han derivat del treball d'aquesta tesi doctoral:

- Immunochemical Determination of Pyocyanin: A New Strategy for *Pseudomonas aeruginosa* Specific Diagnostic. C. Pastells, N. Pascual, F. Sanchez and M.-P Marco. *Submitted to Anal Chem.*
- An Immunochemical Strategy to Determine *Staphylococcus aureus* based on Peptidoglycan Synthetic Peptide Epitopes. C. Pastells, G. Acosta, N. Pascual, M. Royo, F. Albericio and M.-P. Marco. *Analytica Chimica Acta*, **19;889:203-11 (2015)**
- Nanoparticle-based biosensors for pathogenic bacteria detection. N. Sanvicens, N. Pascual, C. Pastells and M.-P. Marco. *Trends in Analytical Chemistry*. **28 (11), 1243-1252 (2009)**.
- Compuestos y sus usos como haptenos para la detección de *Staphylococcus aureus*. Inventores: M.-P. Marco, N. Pascual, C. Pastells. Número de aplicación: P201530780. Propiedad: CSIC (80%); CIBER-BBN (20%).
- Haptenos y conjugados derivados de la piocianina, anticuerpos de los mismos, y métodos inmunoquímico para la detección de infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Inventores: M.-P. Marco, N. Pascual, C. Pastells, F. Sánchez-Baeza, A-P. Villaverde, E. Rodríguez-Carmona. Número de aplicación: P201330312. Propiedad: CSIC (76%); CIBER-BBN (21.5%); UAB (2.5%).

Acrònims, abreviatures i sigles

En la present memòria, s'ha decidit utilitzar la forma d'acrònims i abreviatures en la forma original en anglès, la llengua més habitual de difusió científica. A continuació es detallen els acrònims i abreviatures utilitzats en aquest treball amb la traducció al català i el nom en anglès en cursiva. En els casos en què els noms en català i en anglès d'alguns compostos són molt semblants només s'ha especificat el primer.

$^1\text{H NMR}$	Resonància magnètica nuclear de protó (<i>Proton Nuclear Magnetic Resonance</i>)
1-OHphz	1-hidroxifenazina (<i>1-hydroxyphenazine</i>)
Ab	Anticòs (<i>Antibody</i>)
Abs	Absorbància
Ag	Antigen
AIDS	Síndrome d'immunodeficiència adquirida (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
A_{\max}	Absorbància màxima
A_{\min}	Absorbància mínima
Aph	Fosfatasa alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
As	Antisèrum
As230	Antisèrum 230 (policlonal de conill contra 1-OHphz)
As291	Antisèrum 291 (policlonal de conill contra la paret bacteriana de <i>S. aureus</i>)
BAL	Rentats broncoalveolars (<i>BroncoAlveolar Lavage</i>)
BAS	Broncoaspirats (<i>Bronchial ASpirate</i>)
BSA	Albúmina de sèrum boví (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CF	Fibrosi Quística (<i>Cystic Fibrosis</i>)
CFTR	Conductes transmembrana reguladors de la fibrosi quística (<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>)
CFU	Unitat Formadora de Colònies (<i>Colony Forming Units</i>)
CLIA	Immunoassaig lligat a quimioluminiscent (<i>ChemiLuminiscence ImmunoAssay</i>)
Cifa	Factor d'aglutinació A (<i>clumping factor A</i>)
COPD	Malaltia pulmonar obstructiva crònica (<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>)
CPS	Polisacàrids associats a la membrana (<i>Cell wall associated Polisacarides</i>)
DNA	Àcid desoxiribonucleic (<i>DeoxyriboNucleic acid</i>)
DTT	Ditioteitrol (<i>DiThioThreitol</i>)

ECDC	Centre europeu de prevenció i control de malalties (<i>European Center for Disease prevention and Control</i>)
EIA	Immunoassaig lligat a enzims (<i>Enzyme ImmunoAssay</i>)
ELISA	Assaig d'immunoabsorció lligat a un enzim (<i>Enzyme Linked ImmunoSorben Assay</i>)
<i>fem</i>	Factor essencial per a la resistència a meticil·lina
<i>femA</i>	Factor essencial per a la resistència a meticil·lina que codifica la proteïna FemA
<i>femB</i>	Factor essencial per a la resistència a meticil·lina que codifica la proteïna FemB
<i>femX</i>	Factor essencial per a la resistència a meticil·lina que codifica la proteïna FemX
FIA	Immunoassaig lligat a fluoròfor (<i>Fluorescence ImmunoAssay</i>)
FucNAc	2-acetamido-2,6-didesoxi galactosa (<i>N-Acetyl-D-fucosamine</i>)
GC	Cromatografia de gasos (<i>Gas Chromatography</i>)
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
GPTMS	3-glicidoxipropiltrimetoxisilà (<i>3-glycidoxypropyltrimethoxysilane</i>)
GO	Glucosa Oxidasa
HGT	Transferència genètica horitzontal (<i>Horitzontal Genetic Transfer</i>)
HAI	Malalties adquirides en hospitals (<i>Hospital Acquired Infection</i>)
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HCH	Hemocianina de cranc (<i>Horseshoe Crab Hemocianin</i>)
HRP	Peroxidasa de rave picant (<i>HorseRadish Peroxidase</i>)
HTS	Processar diverses mostres simultàniament (<i>High-Throughput Screening</i>)
IC _{20, 80, 50, 90}	Concentració d'anàlit necessària per inhibir un assaig immunoenzimàtic competitiu i obtenir un 20, 80, 50, 90% d'absorbància màxima respectivament (<i>Inhibitory Concentration</i>)
Ig	Immunoglobulina
IgG	Immunoglobulina de tipus G
IgM	Immunoglobulina de tipus M
IQS	2-(2-Hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehid (<i>2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde</i>)
LB	Medi de cultiu <i>Luria Bertani</i>
LES	Soques epidèmiques de Liverpool (<i>Liverpool Epidemic Strain</i>)
LOD	Límit de detecció (<i>Limit Of Detection</i>)
LOQ	Límit de quantificació (<i>Limit Of Quantification</i>)

LPS	Lipopolisacarid (<i>Lipopolysaccharide</i>)
mAb	Anticòs monoclonal (<i>monoclonal Ab</i>)
MALDI-TOF-MS	Espectrometria de masses de ionització per desorció per làser assistida per matriu i detecció en temps de vol (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometer</i>)
ManNAcA	Àcid 2-acetamido-2-desoxi-D-manurònic (<i>N-acetylmannosaminuronic acid</i>)
mRNA	Àcid ribonucleic missatger (<i>messenger RNA</i>)
MH	Medi de cultiu <i>Müller Hinton</i>
MIA	Immunoassaig de marcadors magnètics (<i>Magnetic ImmunoAssay</i>)
MRSA	<i>S. aureus</i> resistent a la meticil·lina (<i>Methicillin Resistant S. aureus</i>)
MS	Espectrometria de masses (<i>Mass Spectrometry</i>)
MSSA	<i>S. aureus</i> sensible a la meticil·lina (<i>Metacillin sensitive S. aureus</i>)
MurNAc	Àcid β -(1-4)-N-acetilmuràmic
NADH	Dinucleòtid de nicotinamida i adenina en la seva forma reduïda (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>)
NADPH	Dinucleòtid fosfat de nicotinamida i adenina en la seva forma reduïda (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide phosphate</i>)
N-SIA	iodoacetat de N-succinimida (<i>N-succinimidyl iodoacetate</i>).
N-SMP	3-maleimidopropanoat de succinimida (<i>N-succinimidyl 3-maleimidopropionate</i>)
pAb	Anticòs policlonal (<i>polyclonal Ab</i>)
PBS	Tampó salí fosfat (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBST	PBS amb Tween® 20
PC1-BSA	BSA haptentitzada amb l'haptè PC1 de 1-OHphz (antígen de tapissat)
PCA	Àcid fenazin-1-carboxílic (<i>phenazine-1-carboxylic acid</i>)
PCN	Fenazin-1-carboxamida (<i>phenazine-1-carboxamide</i>)
PCR	Reacció de polimerasa en cadena (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PSau3-BSA	BSA haptentitzada amb l'haptè PSau3 de la paret bacteriana de <i>S. aureus</i> (antígen de tapissat)
PG	Peptidoglicà (<i>peptidoglycan</i>)
PH	Hidrolases del peptidoglicà (<i>Peptidoglycan Hydrolases</i>)
PoC	Anàlisi prop del pacient (<i>Point of Care</i>)
PQS	Senyal quinolínic de <i>Pseudomonas</i> (<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i>)

PVL	Leucocidina de Panton-Valentine (<i>Panton-Valentine-Leukocidin</i>)
PYO	Piocianina (<i>pyocyanin</i>)
rAb	Anticòs recombinat (<i>recombinant Ab</i>)
RNA	Àcid ribonucleic (<i>RiboNucleic Acid</i>)
rRNA	Àcid ribonucleic ribosomal (<i>ribosomal RNA</i>)
RFU	Unitats de referència de fluorescència (<i>reference fluorescence units</i>)
RIA	Immunoassaig lligat a un radioisòtop (<i>Radio ImmunoAssay</i>)
RT-PCR	PCR de transcriptasa inversa (<i>Reverse Transcriptase PCR</i>)
Rbo-P	Ribitol fosfat (<i>Ribitol Phosphate</i>)
SAg	Superantigen (<i>Superantigen</i>),
SDS	Dodecil sulfat de sodi (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SE	Enterotoxina estafilocòccica (<i>Staphylococcal Enterotoxin</i>)
SEM	Microscopi d'escombratge d'electrons (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SEMPSPH	Societat Espanyola de Medicina Preventiva, Salut Pública i Higiene
SPR	Ressonància de plasmó superficial (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
TA	Àcid teicoic (<i>Teichoic Acid</i>)
TE	Traçador enzimàtic
TEM	Microscopi de transmissió d'electrons (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TFMSA	Àcid trifluorometan sulfònic (<i>TriFluorMehtane Sulfonic Acid</i>)
TLC	Cromatografia en capa fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TRITC	Isocianat de la tetrametilrodamina (<i>tetramethyl rhodamine isothiocyanate</i>)
TSST	Toxina de síndrome de xoc tòxica (<i>Toxic Shock Syndrome Toxin</i>)
UV-vis	Espectrometria d'ultravioleta-visible (<i>UltraViolet-visible spectroscopy</i>)
VISA	<i>S. aureus</i> de resistència intermèdia a la vancomicina (<i>Vancomycin Intermediate S. aureus</i>)
VRSA	<i>S. aureus</i> resistent a la vancomicina (<i>Vancomycin Resistant S. aureus</i>)
WHO	Organització Mundial de la Salut (<i>World Health Organization</i>)
WTA	Àcid teicoic de paret (<i>Wall Teichoic Acid</i>)

1 Introducció: Diagnòstic de malalties infeccioses

1.1 PROBLEMÀTICA DE LES MALALTIES INFECCIOSES

Les malalties infeccioses estan causades per microorganismes patògens, que poden ser bacteris, virus, paràsits o fongs. La transmissió de les malalties pot ser de manera directa, o indirectament d'una persona a una altra². D'entre tots els tipus de malalties infeccioses, les nosocomials (també anomenades malalties adquirides en hospitals – HAI, *hospital acquired infection*) ocupen un dels punts més alarmants en les societats desenvolupades. S'estima que a Europa cada any hi ha 4,2 milions de HAI³. La mitjana de prevalença^a de residents europeus que han patit com a mínim una HAI és del 3,4% (n=2.626 d'un total de 77.264), amb un rang que va des del 0,4% a Croàcia fins al 7,1% a Portugal. D'entre els 2.626 HAI comptabilitzats, les malalties més freqüents varen ser problemes en el tracte respiratori (31,2%), infeccions en el tracte urinari (31,2%) i infeccions a la pell (22,8%)³.

La sèpsia o septicèmia es defineix com un conjunt d'infeccions generalitzades greus, que són degudes a l'existència d'un focus infecció dins el cos del qual constantment passen gèrmens patògens a la sang circulant. Normalment, el sistema immune i el neuroendocrí controlen el procés inflamatori local per eradicar els patògens invasors. Quan aquests sistemes fallen, es produeix la inflamació sistèmica. El xoc sèptic pot afectar qualsevol part del cos. L'evidència de la infecció sistèmica consisteix en dos o més dels símptomes següents: increment o disminució de la temperatura o nombre de leucòcits, taquicàrdia o augment de la respiració⁴.

Segons els estudis fets a Espanya per la Societat Espanyola de Medicina Preventiva, Salut Pública i Higiene (SEMPSPH) i el Centre Europeu de Prevenció i Control de Malalties (ECDC, *European Center for Disease Prevention and Control*), durant el 2013 es van aïllar més de 200 espècies de microorganismes causants d'infeccions nosocomials i infeccions comunitàries. D'entre els microorganismes més comunament aïllats en malalties nosocomials trobem *Escherichia coli* (15,78%), *Pseudomonas aeruginosa* (11,05%), *Staphylococcus aureus* (9,59%), *Enterococcus faecalis* (6,85%), *Staphylococcus epidermidis* (6,24%), *Klebsiella pneumonia* (5,42%), *Candida albicans* (4,76%) i *Enterococcus faecium* (4,04%)⁵.

L'actual problemàtica de les malalties infeccioses rau en dos fets importants: per una banda, la resistència bacteriana als antibiòtics i, per l'altra, la manca de sistemes de diagnòstic fiables i eficaços que permetin identificar el microorganisme patògen en un temps raonable (vegeu apartat 1.2). Pel que fa al primer fet, s'hi suma la

^a PREVALENCIA: Proporció d'individus afectats per una mateixa malaltia en una població determinada i durant un temps determinat.

manca d'aparició de noves molècules amb propietats antimicrobianes. Quant al diagnòstic, aquest escenari determina la prescripció inadequada d'antibiòtics d'ampli espectre, la qual cosa redunda també en un increment dels fenòmens de resistència bacteriana. Les limitacions de les actuals eines de diagnòstic poden tenir conseqüències molt greus quan la infecció passa a la sang, on tan sols 1 unitat formadora de colònies (CFU, *colony forming unit*) pot arribar a tenir conseqüències fatals.

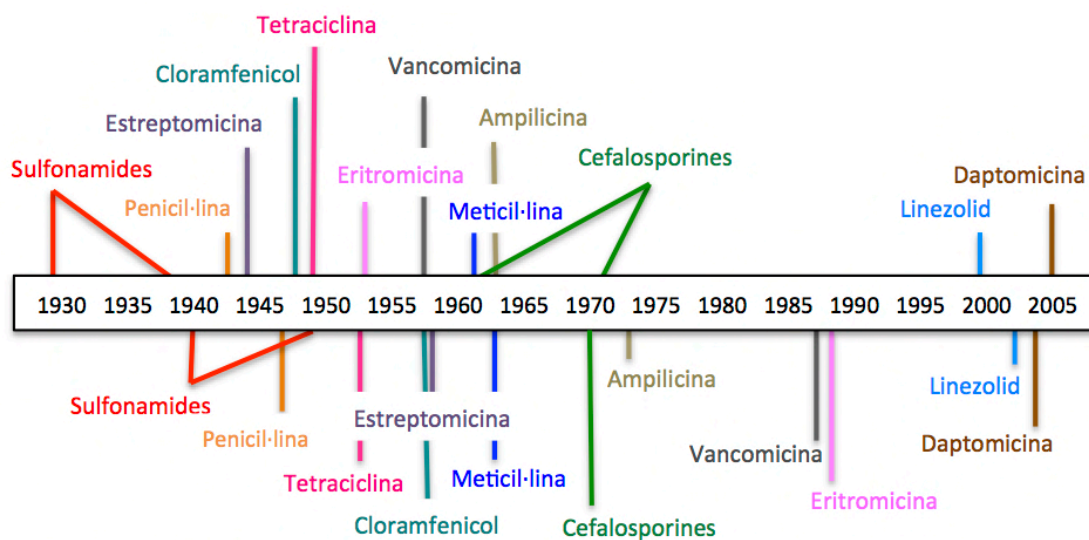
A nivell europeu, la prevalença dels residents que varen rebre almenys un agent antimicrobià durant els últims anys va ser del 4,4% (n=3367 d'un total de 77.264), oscil·lant entre l'1,0% a Hongria i el 12,1% a Grècia. Un total de 3.561 agents antimicrobians es van utilitzar en els centres d'atenció primària, la majoria administrats per via oral (87,3%). Els antimicrobians van ser els més freqüentment prescrits per al tractament d'una infecció (72,8%), concretament les infeccions del tracte respiratori (39,0%), infeccions del tracte urinari (35,1%) i infeccions de la pell i de les ferides (16,0%). Els agents restants van ser prescrits de manera profilàctica (27,2%), dels quals en un 80,9% serveixen principalment per prevenir l'aparició d'infeccions del tracte urinari. Els antibacterians per a ús sistèmic^b van representar el 97,0% de tots els antimicrobians reportats. Dins d'aquest grup, els β -lactàmics i penicil·lines (29,3%), altres antibacterians (19,8%) i les quinolones (16,0%) van ser les classes d'ús més comuns³.

Des dels inicis, el desenvolupament de nous antibiòtics ha anat acompanyat de l'aparició del fenomen de la resistència antimicrobiana (vegeu Figura 1.1), essent especialment alarmant quan es tracta de microorganismes resistents a múltiples drogues, els quals no han deixat d'incrementar en els últims anys. Per citar alguns exemples, tant en *Escherichia coli* com en *Klebsiella pneumònia* s'ha detectat una tendència en augment de la multiresistència d'aquests patògens, i les opcions de tractament per als pacients queden restringides a pocs antibiòtics, com ara els carbapenems. Conseqüentment a l'ús en augment d'aquesta classe d'antibiòtics, la resistència vers els carbapenems esta també incrementant, fet que limita encara més les opcions de tractament per als pacients. L'evolució de *S. aureus* resistent a la meticil·lina (MRSA, *methicillin resistant S. aureus*) és més esperançadora. MRSA ha estat un dels punts de mira de la resistència antimicrobiana dels últims anys, tant per la seva alta presència en hospitals com per la dificultat que suposa l'eradicació d'aquests patògens. Amb tot, en els últims quatre anys el nombre de casos aïllats a Europa s'està estabilitzant o fins i tot està disminuint en alguns països³ gràcies a les campanyes promogudes per un ús apropiat dels antibiòtics per part diferents organitzacions i agències governamentals com ara l'Organització Mundial de la Salut

^b SISTÈMIC: En medicina, relatiu o pertanyent a tot l'organisme, a tot un sistema.

(WHO, *World Health Organization*), l'administració d'Aliments i Fàrmacs dels Estats Units (FDA, *Food and Drug Administration*), la ECDC, la iniciativa de solució a la resistència antimicrobiana promoguda pels Centres per al Control i Prevenció de les Malalties dels Estats Units (CDC, *The Centers for Disease Control and Prevention*), el Fòrum-Federal de la Casa Blanca pel Compromís contra la Resistència Antimicrobiana (*White House Forum-Federal Engagement in Antimicrobial Resistance*), el Grup de Treball Transatlàntic sobre la Resistència Antimicrobiana (TAFTAR, *Transatlantic Task Force on Antimicrobial Resistance*), l'Agència Europea dels Medicaments (EMA, *European Medicines Agency*), l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA, *European Food Safety Authority*), etc.

Ús de l'antibiòtic



Reistència observada

Figura 1.1 Evolució temporal de l'ús de nous antibiòtics i la resistència antimicrobiana observada. El cronograma mostra en la part superior l'any en què cadascun dels antibiòtics es va desenvolupar i en la part inferior la data en què es va observar per primer cop la resistència antimicrobiana de cadascun dels antibiòtics. Figura adaptada⁶.

Les conseqüències que deriven de la resistència antimicrobiana són, d'una banda, el fracàs dels tractaments i l'increment de la mortalitat i, de l'altra, l'augment de la despesa sanitària. Cada any als Estats Units, els bacteris resistents als antibiòtics emmalalteixen dos milions de persones, i almenys 23.000 persones moren com a resultat directe d'aquestes infeccions. A Europa s'estima que aproximadament 25.000 pacients moren cada any per infeccions causades per microorganismes multiresistents, i l'impacte sobre el cost sanitari d'aquestes malalties pot arribar a ser d'1,5 bilions d'euros cada any⁷. Per tal de millorar la situació, és important l'ús prudent dels antibiòtics per garantir-ne l'efectivitat i minimitzar la creació de noves

resistències i al mateix temps desenvolupar nous antimicrobians per millorar l'eficàcia i garantir l'èxit dels tractaments³.

Tradicionalment s'han descrit dos grans tipus d'antibiòtics: els **bactericides**, que maten el bacteri, i els **bacteriostàtics**, que inhibeixen el creixement del bacteri. Generalment actuen inhibint les funcions bacterianes essencials per al creixement, com ara la síntesi de la paret bacteriana (els antibiòtics β -lactàmics) o la despolarització^c de la paret bacteriana (daptomicina), la replicació de l'àcid desoxiribonucleic (DNA, *DeoxyriboNucleic acid*) o la transcripció de l'àcid ribonucleic (RNA, *ribonucleic acid*) (com ara les fluoroquinolones) i la síntesi de proteïnes (per exemple els aminoglicòsids) (vegeu Figura 1.2). A fi d'augmentar l'èxit de les noves generacions d'antibiòtics, s'han de considerar nous models d'acció aprofitant el coneixement adquirit durant dècades sobre els models d'infecció bacteriana. Seguint aquesta línia, algunes de les noves aproximacions es basen en la disrupció de la interacció entre l'hoste i el patògen⁶.

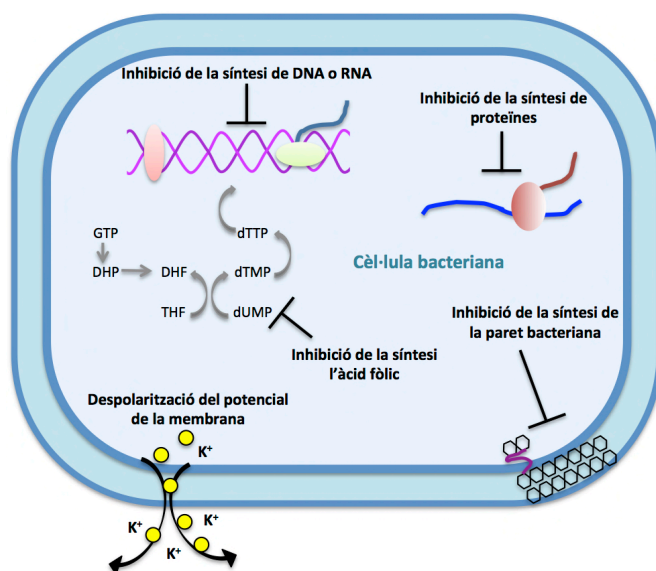


Figura 1.2 Dianes tradicionals dels antibiòtics: inhibidors de la síntesi DNA o RNA (ex. fluoroquinolones), inhibició de la síntesi de proteïnes (ex. aminoglicòsids), inhibició de la síntesi de la paret bacteriana (ex. lactames), inhibició de la síntesi de l'àcid fòlic (ex. sulfonamides) o despolarització del potencial de la membrana bacteriana (ex. daptomicina). Reproduït i adaptat⁶.

1.2 ACTUALS MÈTODES DE DIAGNÒSTIC: CULTIU CEL·LULAR

El cultiu cel·lular és la metodologia de referència per a la detecció i identificació de microorganismes viables en els fluids biològics. Aquesta tècnica, a diferència d'algunes altres, permet obtenir informació sobre la susceptibilitat dels agents infecciosos contra els antimicrobians. Un aspecte de rellevància per a la prescripció de la teràpia adequada i la consegüent cura del pacient⁸. Actualment, els cultius de

^c DESPOLARITZACIÓ: És un canvi positiu en el curs del potencial de la membrana cel·lular que dona un caràcter més positiu a la membrana i, per tant, elimina la polaritat que sorgeix de l'acumulació de càrregues negatives a la membrana interna i les càrregues positives a la membrana externa.

sang es realitzen en sistemes de monitorització en continu totalment automatitzats. Aquests instruments detecten el creixement microbià per anàlisi de CO₂ alliberat mitjançant sensors fluorescents (Bactec 9240; Becton Dickinson) o colorimètrics (BacT/Alert; bioMerieux, França) o de manera alternativa mesuren els canvis de pressió de l'ampolla deguts al consum i/o producció de gasos (VersaTREK; TREK Diagnostic Systems).

Malauradament, aquesta metodologia presenta certs inconvenients. La diversitat de microorganismes que es poden detectar en els fluids biològics complica els protocols de cultius cel·lulars i implica l'ús de diferents medis segons els tipus de microorganisme o condicions de cultiu. Per això, les pautes establertes per als cultius cel·lulars recomanen la recollida de dos a tres sets de mostra per a cada episodi infecció separats en ampolles en condicions aeròbiques i anaeròbiques per garantir el rang de detecció de tots els patògens⁹. Però el que possiblement sigui el desavantatge més rellevant del cultiu cel·lular és la falta de sensibilitat del mètode i els temps d'espera massa elevats (mínim de 48-72 h) per a la identificació etiològica de l'agent infecció⁹. En el cas de patògens de creixement lent o creixement complicat com ara espècies (spp., *species*) de *Bartonella*, *Francisella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Nocardia* spp., diversos tipus de fongs o de creixement poc uniforme en els cultius com ara *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila pneumoniae* i *Tropheryma whipplei*, les tècniques basades en l'immunodiagnòstic o tècniques moleculars són altament preferibles¹⁰.

Per tots aquests motius, diversos grups d'investigació adreçen els seus esforços al desenvolupament de mètodes alternatius per a la detecció de patògens a fi de millorar els inconvenients anteriorment citats.

1.3 NOVES ESTRATÈGIES DE DIAGNÒSTIC

Els mètodes de diagnòstic basats en la detecció de DNA, detecció de proteïnes, tècniques immunoquímiques o sistemes d'espectroscòpia de masses estan agafant relleu per tal de cobrir les deficiències que presenten els cultius microbiològics. L'objectiu principal de les noves aproximacions és minimitzar el temps d'obtenció dels resultats respecte al cultiu, millorar-ne la sensibilitat i alhora mantenir l'especificitat i simplicitat de la tècnica^{11,12}.

Les noves aproximacions també pretenen aportar altres atractius, com ara la possibilitat de desenvolupar sistemes multiplexats amb capacitat per detectar més d'un patògen al mateix temps o el desenvolupament de sistemes portables que permetin realitzar mesures prop del pacient (PoC, *Point of Care*). En aquest segon

cas, idealment el metge podria obtenir el resultat de la prova clínica a la mateixa consulta i prescriure el tractament al pacient escurçant considerablement els temps i els costos del diagnòstic. A més, s'incrementarien les expectatives de millora de la salut del pacient a causa de la rapidesa amb què s'estaria actuant sobre el focus d'infecció.

1.3.1 TÈCNiques BASADES EN LA DETECCIÓ DEL DNA

Kary Mullis va ser guardonat amb el premi Nobel de química pel desenvolupament de la tècnica de **PCR** (reacció en cadena de la polimerasa, *Polimerasa Chain Reaction*)¹³, que permet l'amplificació del material genètic mitjançant un procés cíclic que crea un gran nombre de còpies idèntiques. Aquesta tècnica ha estat de gran utilitat per a la clonació del DNA, per a l'enginyeria genètica o estudis de seqüenciació. Respecte a l'ús de la PCR com a tècnica analítica, inicialment existia una limitació derivada del fet de no saber la quantitat inicial de la plantilla de DNA (*DNA template*) existent a la mostra, ja que en el resultat final s'obtenia la mateixa quantitat de cadascuna de les cadenes de DNA indistintament de la quantitat inicial present. Aquest problema es va solucionar el 1992 amb el desenvolupament de la **PCR en temps real** (*real time PCR*)¹⁴ on la quantitat de producte format es monitoritza al llarg de la reacció mitjançant marcadors (generalment fluorescents) que permeten quantificar el nombre d'amplificacions realitzades. Amb aquestes millores, la PCR en temps real s'ha pogut aplicar a la detecció de patògens entre d'altres aplicacions^{13,15,16}.

Entre les variants de les PCR també hi ha la **PCR multiplexada**, que permet la detecció de diversos microorganismes mitjançant la introducció de diferents iniciadors (*primers*) per ampliar les regions codificadores de DNA dels gens específics de cada microorganisme. Per al bon funcionament de la PCR multiplexada, s'ha de prestar especial atenció al disseny dels iniciadors, com ara l'homologia dels iniciadors amb les seqüències plantilla d'àcid nucleic, la llargada, el contingut de guanina-citosina i les diferents temperatures de desnaturalització^{17,18}.

Entre les limitacions de la tècnica de PCR trobem la difícil manipulació de la tècnica i la no discriminació entre microorganismes viables i no viables. Aquest últim inconvenient s'ha solucionat amb el desenvolupament de la **PCR de transcriptasa inversa** (RT-PCR, *reverse transcriptase PCR*), que sintetitza DNA complementari transcrit a partir del RNA present a la mostra¹⁹. El RNA és més làbil que el DNA i, per tant, una millor diana per a la identificació de viables en la mostra. Especialment el

mRNA^d, el qual degrada en pocs minuts i la presència de seqüències de mRNA és indicació de patògens viables^{20,21}.

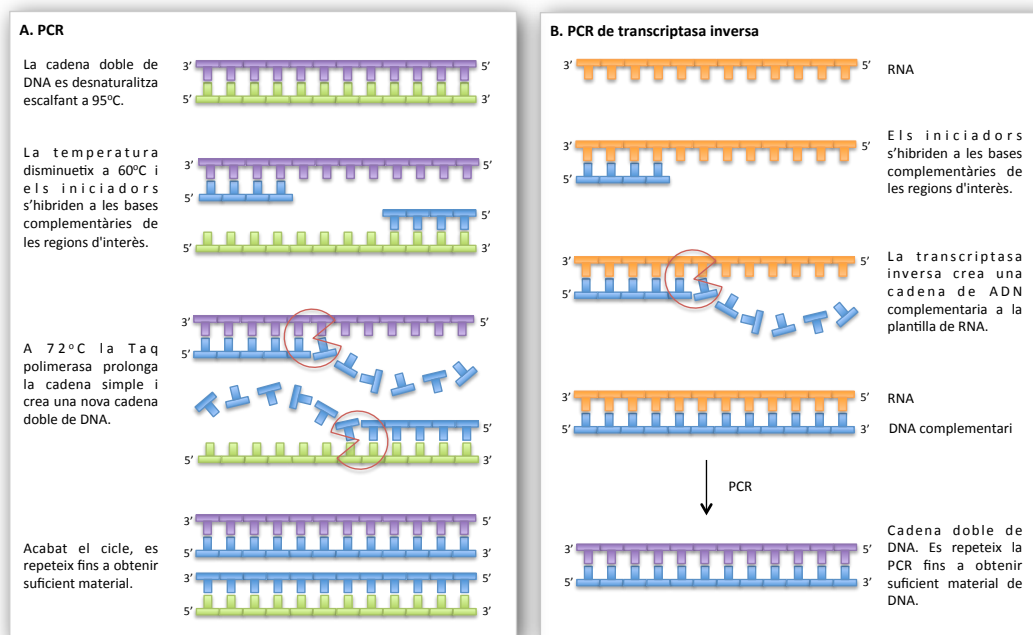


Figura 1.3 Esquema de les diferències entre **A.** PCR i **B.** PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR).

El test LightCycler SeptiFast[®] de la multinacional alemanya Roche Diagnostics és un dels tests comercials de més rellevància a dia d'avui basat en PCR multiplexada en temps real. L'ampli rang de patògens que detecta, els curts temps de la tècnica i l'alta sensibilitat i sensitivitat fan d'aquest dispositiu molecular una de les opcions comercials més atractives per afrontar la detecció de patògens a dia d'avui. Les sondes de diagnòstic per a la PCR estan dirigides a la seqüenciació de transcripció interna del rRNA, seqüències situades entre les subunitats 16S i 23S per al rRNA bacterià i la subunitat 18S per al rRNA fúngic. Un cop el material genètic s'ha amplificat s'identifiquen les espècies mitjançant l'anàlisi de corbes de fusió amb un marcatge fluorescent. El LightCycler SeptiFast[®] detecta 25 patògens comuns, d'entre els quals hi ha grampositius, gramnegatius i fongs (vegeu Taula 1.1) directament en sang i sense necessitat de precultiu per enriquir la mostra. La sensibilitat analítica del mètode reportada per l'empresa és de 100 CFU mL⁻¹ per *Candida glabrata*, *Streptococcus spp.*, i *Staphylococcus spp.* coagulasa-negatiu, i 30 CFU mL⁻¹ pels altres microorganismes^{18,22,23} amb un temps d'anàlisi de 5 h²⁴.

^d mRNA (RNA missatger): És el RNA que conté la informació genètica procedent del DNA del nucli cel·lular a un ribosoma. Actua com plantilla patró per a la síntesi de proteïnes i per tant determinarà l'orde d'unió dels aminoàcids que formaran la proteïna.

Altres cases comercials també ofereixen opcions similars, amb capacitat de detectar entre 25 i 300 patògens, amb la possibilitat de distingir gens característics de resistències antimicrobianes o soques virulentes i amb temps de detecció de 3 a 12 h. Per citar alguns exemples, VYOO® (SIRSLab, Alemanya), Magicplex™ Sepsis Real-time test (Seegene, Corea) i SepsiTest™ (Molzlym, Alemanya)²⁴.

Taula 1.1 Panell de patògens detectats pel SeptiFast®. †Compresos *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. pasteurii*, *S. warneri*. ‡Compresos *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. constellatus*, *S. cristatus*, *S. vestibularis*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. milleri*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. thermophilus*, *S. parasanguinis*.

Bacteris gramnegatius	Bacteris grampositius	Patògens fúngics
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coagulase-negative Staphylococci [†]	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Llebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus spp.</i> [‡]	<i>Candida krusei</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Proteus mirabilis</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

La PCR és una eina de diagnòstic poderosa que permet l'anàlisi de mostres microbiològiques així com l'anàlisi de mostres en matrius complexes (fluids biològics o mostres alimentàries) amb bones correlacions amb els cultius cel·lulars tant en sensibilitat (100%) com en selectivitat (92-99%)^{25,26}. Per contra, són tècniques costoses, requereixen operadors altament formats i el temps d'anàlisi està entorn de les 24-72 h, un temps massa elevat quan es tracta de pacients amb situacions crítiques, com ara la septicèmia.

1.3.2 IMMUNOASSAJOS

El 1959, Berson i Yallow varen desenvolupar una de les primeres aplicacions basades en el assajos immunoquímics, un assaig per a la detecció de la insulina humana²⁷ gràcies al qual varen obtenir el premi Nobel de medicina el 1977 en reconeixement a aquest gran avenç científic²⁸. Des d'aleshores, a causa de la seva versatilitat i els avantatges que presenten els immunoassajos per al diagnòstic clínic (ràpids, cost-efectius (4-10 €/mostra) i de fàcil manipulació), s'han desenvolupant immunoassajos

per a la detecció de diverses malalties mitjançant la mesura d'anàlits que van des d'hormones i proteïnes fins a drogues en matrius complexes com ara sang, urina o líquid cefaloraquídi²⁹.

Els immunoassajos són tests bioquímics que permeten mesurar la presència i/o concentració de molècules en solució emprant les immunoglobulines com a elements específics de bioreconeixement. Segons el procés d'obtenció dels anticossos, els podem diferenciar en tres grups: anticossos policlonals (**pAb**, *policlonal antibodies*), monoclonals (**mAb**, *monoclonal antibodies*) i recombinats (**rAb**, *recombinant antibodies*), els quals tots ells poden ser emprats per al desenvolupament d'immunoassajos. En aquesta tesi tots els anticossos produïts han estat policlonals de conill.

Un immunoassaig es basa en la quantificació del complex Ag-Ab mitjançant el marcatge d'algun dels immunoreactius. La sensibilitat analítica dels immunoassajos depèn en gran mesura de l'afinitat dels anticossos utilitzats i el senyal de detecció que s'utilitza. La naturalesa del marcatge pot ser molt diversa: Radioisòtops (**RIA**, *radio immunoassay*)³⁰, enzims (**EIA**, *enzyme immunoassay*)³¹, fluoròfors (**FIA**, *fluorescence immunoassay*)³², quimioluminiscent (**CLIA**, *chemiluminescence immunoassay*)³³ o marcadors magnètics (**MIA**, *magnetic immunoassay*)^{34,35}. Els marcadors radioisòtops varen ser els primers d'empresar-se, però amb el temps s'ha intentat trobar alternatives més sostenibles a nivell mediambiental, menys perjudicials per a la salut i que milloressin l'amplificació del senyal. Els EIA ofereixen una bona amplificació del senyal a causa de l'activitat enzimàtica i, per aquest motiu, enzims com ara la peroxidasa de rave picant (HRP, *horseradish peroxidase*), la fosfatasa alcalina (Aph, *alkaline phosphatase*) i la glucosa oxidasa (GO, *glucose oxidase*) són alguns dels més utilitzats.

Un dels EIA més estesos és l'ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), que combina l'ús de suport sòlid amb el marcatge enzimàtic d'un dels immunoreactius. Freqüentment, el suport sòlid és una microplaca de 96 o 384 pous, que permeten processar diverses mostres simultàniament (HTS, *High-Throughput Screening*)²⁷, fet que incrementa l'eficàcia de la tècnica. Els formats d'immunoassaig varien segons el tipus d'anàlit a detectar. Generalment per a anàlits grans s'empra el **format tipus sandvitx** i per a la detecció de molècules de baix pes molecular, el **format de tipus competitiu**. En competència s'anomena format **directe** quan el complex Ag:Ab es detecta mitjançant el marcatge d'un dels dos immunoreactius, o **indirecte** quan el senyal ve donat per un anticòs secundari marcat. En els formats de competència el senyal és inversament proporcional a la concentració d'anàlit³⁶.

Els avenços continus han permès el desenvolupament d'immunoassajos amb sensibilitats que arriben fins a concentracions picomolars. Com ara Mitzutani *et al.*³⁷, que varen desenvolupar un EIA per a la determinació d'insulina amb un LOD de 2 pM (10 ng L⁻¹). L'eficiència dels immunoassajos també s'ha vist realçada pels formats multiplexats i els sistemes automatitzats mitjançant l'ús d'analitzadors com el Cobas (Roche), el Vista (Siemens), el AxSYM (Abbott) o el Best 200 (Biokit)³⁸.

Els immunoassajos també són una bona eina per a la detecció no tan sols d'antigens sinó també d'anticossos. I, en aquest sentit, moltes de les tècniques immunoquímiques de detecció de malalties infeccioses es basen en **estudis serològics** adreçats a la detecció dels anticossos circulants en la sang. En aquesta línia, la CDC recomana que en un primer estadi la detecció del virus de la immunodeficiència humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*) sigui mitjançant la combinació d'immunoassajos que detectin anticossos contra el HIV-1 i HIV-2 i antigens del HIV-1 p24. I posteriorment, si es creu convenient, fer ús de les tècniques basades en la detecció de DNA³⁹. Aquestes últimes presenten un clar avantatge intrínsecament relacionat amb la detecció del DNA, que permet obtenir informació a nivell genòmic del patogen o microorganisme.

Altres formats d'immunoassaig, com els assajos d'**aglutinació de làtex** o **immunoassajos de flux lateral** (o *test de tira*)⁴⁰, també han tingut grans aplicacions per la seva senzillesa i l'avantatge de poder interpretar el resultat a ull nu. Vegeu alguns exemples comercials per a la detecció de *S. aureus* o *E. coli*: Staphylase TestTM (Thermo Scientific), Masta-StaphTM (MastDiagnostics), Staphyloslide Latex Test[®] (Becton Dickinson), Staphytest Plus[®] (Oxoid), Dry Spot Staphytest Plus[®] (Oxoid), Slidex Staph Plus[®] (bioMérieux), O157 Coli-Strip (CorisBioconcept), ImmunoCard STAT![®] *E. coli* O157 Plus (Meridian Bioscience). Aquests tests permeten la detecció en aproximadament 15 minuts però les mesures s'han de fer individualment. Molts d'aquests tests no donen informació sobre l'especificitat de l'anticòs emprat ni tampoc del LOD; d'altres que donen valors de LOD estan entorn de les 10³ CFU mL⁻¹⁴¹.

Més endavant, es descriu amb més detall l'estat de la qüestió sobre els immunoassajos per a *S. aureus* i *P. aeruginosa* (vegeu apartat 3.1.5 i 4.1.5, respectivament).

1.3.3 BIOSENSORS

Els biosensors són dispositius analítics que integren un element de bioreconeixement íntimament associat a un microsistema de transducció de manera

que permet traduir el procés de reconeixement a un senyal quantificable. Podem classificar els biosensors, segons la funció de l'element de reconeixement, en **catalítics** o d'**afinitat**. En els **biosensors d'afinitat**, el reconeixement ve donat per la formació d'un complex anàlit: receptor. L'element de bioreconeixement pot ser de naturalesa biològica o biomimètica, com ara anticossos, cèl·lules o teixits, proteïnes, àcids nucleics (DNA o RNA), aptàmers^{e 42} o receptors d'empremta molecular. Quan l'anticòs és l'element de bioreconeixement parlem d'**immunosensor**. A causa de la versatilitat dels anticossos i la possibilitat que ofereixen de detectar un gran ventall de molècules, aquests han estat uns dels sensors més explotats.

El principi de transducció que incorpora el biosensor ens permet establir una segona classificació: **òptics** (detecten variacions de les propietats òptiques d'un sistema com a conseqüència del reconeixement molecular)⁴³, **electroquímics** (monitoritzen canvis produïts en el senyal elèctric a causa del reconeixement molecular en la superfície de l'electrode de treball)^{44,45}, **termomètrics** (s'immobilitzen els elements de bioreconeixement sobre una superfície sensora de temperatura i es registren els canvis de calor produïda o absorbida a causa de la reacció de bioreconeixement) o **piezoelèctrics** (mesuren el canvi de freqüència originada pel reconeixement molecular sobre un component piezoelèctric)⁴⁶ (vegeu Figura 1.4).

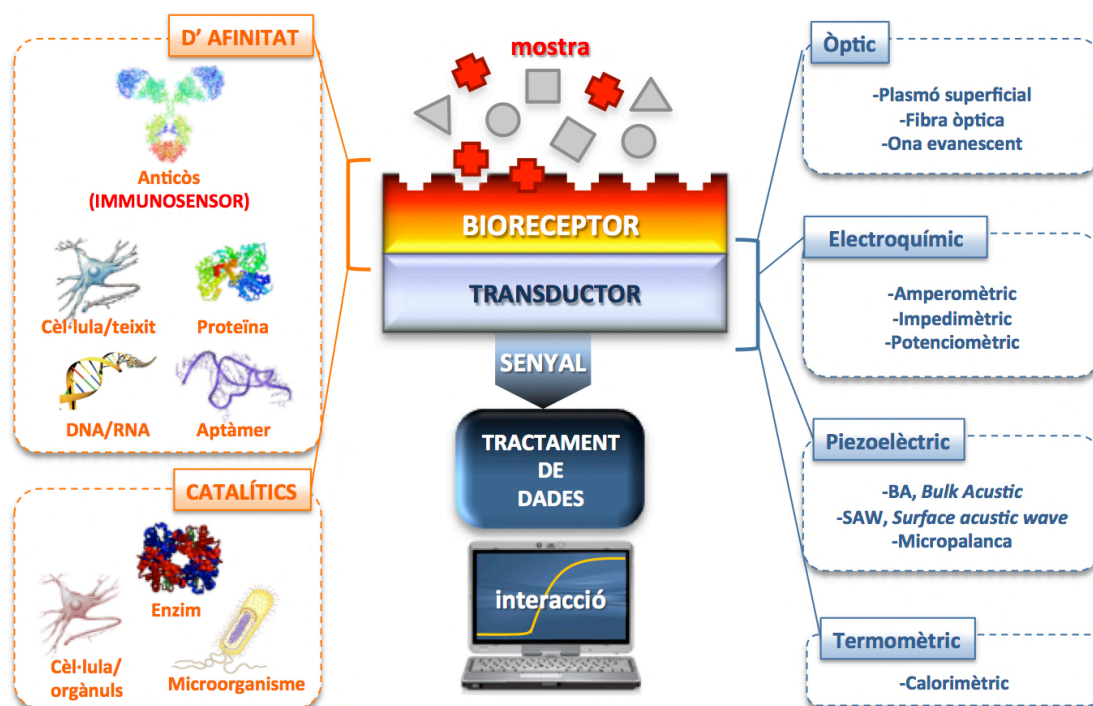


Figura 1.4 Esquema típic d'un biosensor amb les seves tres parts associades: **a)** Plataforma sensora biofuncionantitzada per al reconeixement específic. **b)** Plataforma de transducció que genera un senyal mesurable **c)** Amplificador i processador de la senyal per donar una estimació de la quantificació de l'anàlit capturat

^e DNA o RNA sintètic d'una sola cadena d'oligonucleòtids (generalment <100 nucleotids).

La finalitat dels biosensors és proporcionar un sistema de detecció ràpid, a temps real, sensible i específic. Idealment, pretén ser un sistema miniaturitzat portàtil, que necessita un tractament de mostra mínim o inexistent, amb possibilitat de multidetecció i amb un baix cost de producció. Els biosensors permeten reduir encara més els temps d'anàlisi d'un immunoassaig, assolir temps d'anàlisi en qüestió de minuts. Tanmateix, el cost associat al desenvolupament d'un equip sofisticat és un dels inconvenients. En la definició estricta de biosensor, la plataforma sensora hauria de produir el senyal sense la necessitat de marcatge. Amb tot, hi ha dispositius que tot i no complir el concepte ideal de biosensor també s'han englobat dins d'aquesta classificació, com ara algunes aplicacions on el senyal ve donat per un marcatge fluorescent o un enzim.

Taula 1.2 Recull sensors per a la detecció de patògens

Transductor	Tipus, element de reconeixement	Patogen	Sensibilitat	REF
Òptic	Fibra òptica, pAb captura – mAb detecció	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7 i <i>Salmonella enterica</i>	10^3 CFU mL ⁻¹	47
	SPR, pAb	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	$3 \cdot 10^4$ CFU mL ⁻¹	48
Electroquímic	Impedimètric, Ab	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	83,7 CFU mL ⁻¹	49
	Impedimètric, aptamer	<i>Salmonella typhimurium</i>	600 CFU mL ⁻¹	50
	Amperomètric-magneto, Ab	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 CFU mL ⁻¹	51
Piezoelèctric	BAW, pAb	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0 –1 CFU mL ⁻¹	52
	QCM, pAb	<i>Salmonella typhimurium</i>	$3,2 \cdot 10^6$ CFU mL ⁻¹	53
	Cantilever, pAb	<i>Aspergillus niger</i>	10^3 CFU mL ⁻¹	54
	QCM, MIP	<i>Tobacco mosaic virus</i>	100 ng mL ⁻¹	55

En les últimes dècades s'han desenvolupat una gran quantitat de sistemes biosensors, alguns dels quals, per assolir el requeriments desitjats, combinen més d'una tècnica. És, per exemple, el cas de sensors de DNA o RNA en què prèviament s'ha de dur a terme una amplificació de l'àcid nucleic mitjançant PCR per augmentar el nombre de material nucleic^{56,57}. En la Taula 1.2 es mostra un recull d'alguns dels biosensors desenvolupats per a la detecció de patògens. Malgrat el gran ventall de biosensors desenvolupats, són pocs els dispositius que han arribat a ser comercialitzats. El Breathalyser (Biosensor Systems Design) n'és un dels exemples comercials, un immunobiosensor per a la detecció de la tuberculosi mitjançant el principi d'ona evanescent amb un LOD inferior a les 100 CFU mL⁻¹.

1.3.4 ESPECTROMETRIA DE MASSES

Més recentment, alguns focus d'atenció han estat centrats en l'espectrometria de masses de ionització per desorció per làser assistida per matriu i detecció en temps de vol (MALDI-TOF-MS, *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometer*) com a tècnica per a la identificació de bacteris, fongs i llevats. La tècnica es basa en la proteòmica microbiana i permet de manera ràpida i específica obtenir resultats en un temps considerablement menor als mètodes actuals⁵⁸.

Atès el potencial que ofereix aquesta nova tècnica, al mercat trobem múltiples plataformes comercials disponibles. Bruker Daltonics n'ofereix una de les que ha agafat més renom, el MALDI Biotyper System, amb bons resultats d'identificació⁵⁹. La plataforma inclou un espectròmetre de masses i el programari i base de dades Biotyper. La casa bioMérieux ofereix el VITEK[®] MS amb la base de dades SARAMIS[™] desenvolupada per AnagnosTec GmbH. Les bases de dades actuals inclouen més de 2.000 espècies diferents, però s'han d'actualitzar constantment a causa de la contínua descripció de noves espècies i gèneres.

Les actuals limitacions d'aquesta aproximació rauen en l'anàlisi de les mostres biològiques, a causa de l'elevada presència de biomolècules diverses. En el cas de l'orina cal fer un primer cribatge mitjançant citometria de flux per descartar les mostres negatives. En les mostres de sang, es fa un pre-cultiu més un rentat (*clean-up*) de la mostra. El *clean-up* consisteix en una primera etapa de separació d'eritròcits, mitjançant centrifugació i rentats o bé mitjançant tubs separadors de sèrum, més una segona etapa d'extracció amb una mescla d'àcid fòrmic/acetonitril. També hi ha disponible l'adreça comercial Sepsityper[®] (Bruker Daltonics). A continuació la mostra d'hemocultiu positiu es pot mesurar per MALDI-TOF-MS. Segons Seng *et al.*, els resultats obtinguts són d'un alt percentatge d'èxit (95.4%) en la identificació dels patògens, però requereix el precultiu dels microorganismes^{24,60}.

Una altra limitació és la identificació de la susceptibilitat antimicrobiana. A causa de l'especial preocupació que causen soques com ara la MRSA, alguns estudis s'han adreçat a la diferenciació de MRSA i MSSA. Tot i que s'han identificat pics diferencials entre els espectres de cadascuna de les soques, no s'ha pogut fer una proposta d'espectre específic per a la identificació de MRSA⁶¹.

Les perspectives futures apunten a una total automatització de la microbiologia clínica i la combinació de més d'una tècnica per aconseguir millors resultats. D'entre les noves directrius en l'espectrometria de masses, algunes d'elles aposten per la combinació amb anticossos per a la captura de determinats anàlits d'interès^{60,62}.

1.3.5 NANOBIOTECNOLOGIA

El terme *nanobiotecnologia* va ser introduït per primera vegada per Richard Feynman el 1959. Des d'aleshores, aquest camp s'ha aplicat de manera multidisciplinària en nombroses àrees de la ciència. La nanobiotecnologia es defineix com l'estudi de la síntesi, de les propietats i les aplicacions de les estructures i els materials que tenen com a mínim una dimensió a l'escala nanomètrica ($< 100 \text{ nm}$)⁶³.

Els materials a escala nanomètrica exhibeixen unes propietats elèctriques, òptiques i magnètiques excepcionals. Aquestes estructures poden ser conjugades a biomolècules per ser explotades pel camp de la detecció⁶³. A continuació se citen algunes de les estructures més remarcables (vegeu Figura 1.5): nanotubs de carboni, nanopartícules (metàl·liques, magnètiques o de materials polimèrics), quantum dots (QD), nanofils (*nanowires*).

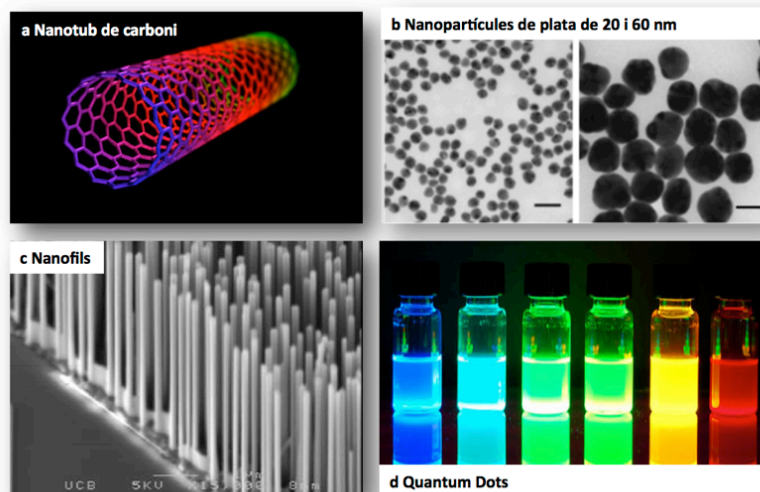


Figura 1.5 a) Estructura d'un nanotub de carboni. b) Imatge d'un microscopi de transmissió d'electrons (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) de nanopartícules de plata. La barra de l'escala és de 50 nm en ambdues fotografies. c) Imatge d'un microscopi electrònic d'escombratge (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) de nanofils de ZnO. d) Fotoluminescència dels quantum dots aliats de CdS_xSe_{1-x}/ZnS de 6 nm de diàmetre.

Els biosensors basats en nanocantilevers o els de microbalances de quarts (citats en l'apartat 1.3.3) són alguns dels exemples de nanotecnologia aplicada a les propietats mecàniques que ens ofereix la possibilitat de detectar reaccions d'afinitat sense necessitat de marcatge. Una altra particularitat de les nanoestructures és l'elevada ratio superfície/volum disponible. Aquesta peculiaritat ofereix un potencial d'amplificació del senyal i millora de la sensibilitat.

Molts d'aquestes sistemes nanoestructurats han estat objecte d'investigació pel que fa al seu potencial en el diagnòstic de malalties infeccioses. Així doncs, recentment

s'ha publicat un immunoassaig de flux lateral amb aptàmers de DNA que permet amplificar el senyal un ordre de magnitud mitjançant l'amplificació de QD que emeten en la zona del vermell. El LOD amb els QD és de 300 CFU mL⁻¹ per *E. Coli* 8739 i 600 CFU mL⁻¹ per *E. coli* O157:H7 en tampó⁶⁴. Un altre exemple, un immunosensor per a la detecció de la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL, *panton-valentine-leukocidin*) de *S. aureus*, on mitjançant l'ús de nanopartícules d'or el LOD de l'assaig respecte d'un ELISA⁶⁵ convencional millora 4 ordres de magnitud (LOD 0,1 ng mL⁻¹). Informació addicional la podreu trobar a l'article de revisió que s'incorpora al final d'aquest apartat.

Mirkin i col·laboradors han ideat els assajos coneguts com a codis de barres biològics (*biobarcodes*), els quals incorporen moltes d'aquestes noves aproximacions nanobiotecnològiques^{66,67}. Els assajos amb **biobarcodes** combinen el potencial de l'elevada diversitat estructural de certes biomolècules, que fa que es puguin utilitzar com a codificadors (ex. l'DNA) combinats amb nanopartícules. El format d'assaig proposat per Mirkin consta de micropartícules magnètiques que contenen l'element de bioreconeixement (anticòs, DNA, etc.) de l'agent a detectar i d'altres partícules també funcionalitzades amb un bioreceptor o amb algun bioreactiu secundari, però que a la vegada incorporen un alt nombre d'oligonucleòtids que codifiquen l'assaig. Així doncs, les seqüències d'oligonucleòtids són úniques per cada anàlit que es vol determinar. Quan les dues partícules interaccionen, és possible separar el complex aplicant un camp magnètic. Posteriorment, es procedeix a l'alliberament dels *biobarcodes* i a la detecció mitjançant nanopartícules d'or que contenen cadenes complementaries a aquest oligonucleòtids. La detecció és en aquest cas de tipus òptic, i aprofia l'amplificació de les propietats òptiques que es produeix quan sobre aquestes nanopartícules es disposa una capa de plata (vegeu Figura 1.6, un exemple d'assaig tipus sandvitx). El sistema permet la detecció de mol·lècules d'origen divers en un mateix assaig, ja que la quantificació final de l'agent es fa mitjançant la detecció dels *biobarcodes*. Per cada reconeixement molecular s'alliberen una gran quantitat de *barcodes* i per tant el sistema permet amplificar el senyal de forma molt eficaç. Posteriorment, els investigadors del grup d'en Mirkin i altres grups han fet servir aquesta aproximació per a la detecció d'una àmplia varietat d'anàlits que inclouen des de seqüències específiques de DNA fins a proteïnes, o fins i tot molècules de baix pes molecular.

Pel que fa a la detecció de microorganismes patògens mitjançant els *biobarcodes*, recentment s'han descrit dues noves aplicacions interessants. D'una banda, un sistema multiplexat que utilitza aquesta tecnologia per a la detecció de *B. anthracis*, *F. tularensis*, i *Y. pestis* mitjançant Ab específics per a cadascun dels patògens, amb LOD de 10² CFU mL en tampó per cadascun d'ells⁶⁸. I, de l'altra, uns *biobarcodes* per a la detecció de mRNA, que tal com s'ha descrit anteriorment pels mètodes de PCR

està intrinsecament relacionat amb les cèl·lules viables. Aquest últim cas no ha estat aplicat a bacteries però podria ser una de les potencials aplicacions⁶⁹.

La nanotecnologia integrada a les plataformes de detecció ofereix la possibilitat d'incrementar les seves prestacions. L'ús individual o bé combinat d'algunes d'aquestes tecnologies pot permetre avançar cap a una nova generació d'eines de diagnòstic de gran fiabilitat, elevada eficàcia i amb noves i millorades característiques pel que fa a la detecció i l'anàlisi de biomolècules. Aquest avenç pot ser de gran utilitat per al diagnòstic mèdic i l'aplicació de tractaments més adients des d'un primer moment.

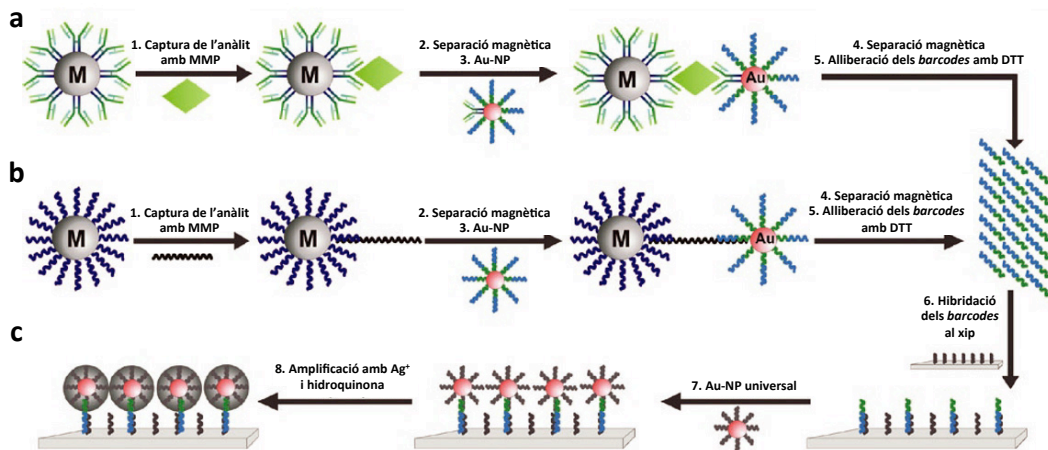


Figura 1.6 Representació de l'assaig *biobarcode* **a)** per a la detecció de proteïnes o **b)** per a la detecció de DNA. **c)** representació escanomètrica del mètode de detecció. Au-NP, nanopartícules d'or; MMP, micropartícules magnètiques. Reproduït de l'article⁷⁰

1.4 PUBLICACIÓ I: BIOESORS BASATS EN NANOPARTÍCULES PER A LA DETECCIÓ DE BACTERIS PATOGENÈS

Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria

Nuria Sanvicens, Carme Pastells, Núria Pascual, M.-Pilar Marco

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 11, 2009

Resum:

La detecció de patògens de manera ràpida i específica segueix sent un dels grans reptes a nivell mundial (vegeu 1.2). Amb aquesta finalitat, diferents disciplines científiques treballen en comú per trobar solucions competents. En aquesta direcció, la nanobiotecnologia, que integra la micro/nanotecnologia i els avanços biotecnològics ha creat grans expectatives per a la creació de noves eines de detecció molecular, i més concretament, per trobar alternatives eficients per a la detecció de patògens.

Aquesta publicació és un recull de diferents estratègies desenvolupades per a la detecció de patògens mitjançant l'ús de nanopartícules. El potencial que ofereixen les nanopartícules és molt versàtil per la gran diversitat de possibilitats que ens ofereixen, variant el material i per tant les propietats de la partícula, la mida de partícula o fins i tot el format de l'assaig de detecció. L'article següent pretén presentar una visió general de les diferents aplicacions publicades per a la detecció de patògens mitjançant l'ús de nanopartícules com a plataforma sensora.

Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria

Nuria Sanvicens, Carme Pastells, Nuria Pascual, M.-Pilar Marco

Reliable methods for rapid, selective detection of pathogens are critical to ensure the safety of food supplies and to diagnose infectious, bacterial diseases accurately.

For certain matrices, particularly in clinical diagnostics, single-cell detection would be desirable, since even such a low concentration of bacteria indicates disease. Many research groups pursue this goal, since current diagnostic methods, including biosensors, do not fulfill this requirement.

The need of more flexible, reliable and sensitive targeting of pathogens has promoted research on the potential of nanoparticles (NPs) and their incorporation into biosensor systems. NPs with particular optical, electrochemical or magnetic properties may increase the speed and the detectability of the diagnostic methods. Moreover, the possibility of using them in a variety of configurations allows us to envisage their implementation as point-of-care systems or multiplexed devices.

We provide a general overview of the progress, the limitations and the future challenges of NP-based biosensors for detection of pathogenic bacteria.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bacteria; Biosensor; Detectability; Diagnostics; Multiplexed device; Nanobiotechnology; Nanoparticle; Pathogen; Point-of-care (PoC) system; Single-cell detection

Nuria Sanvicens,
Carme Pastells,
Nuria Pascual*, M.-Pilar Marco
Applied Molecular Receptors
Group (AMRg), Institute for
Advanced Chemistry of
Catalonia (IQAC) of the Spanish
Council for Scientific Research
(CSIC), and Networking
Research Center on
Bioengineering, Biomaterials
and Nanomedicine (CIBER-
BBN), Jorge Girona, 18-26,
08034 Barcelona, Spain

*Corresponding author.
Tel.: +34 93 4006100;
Fax: +34 93 2045904;
E-mail:
nuria.pascual@cid.csic.es

1. Introduction

Rapid, selective and sensitive detection technologies for pathogenic bacteria are critical in clinical diagnosis, disease control, environmental monitoring and food safety. Conventional identification methods include polymerase chain reaction (PCR) [1], culture and colony counting [2], immunological techniques [3] and fluorescence-based assays using organic dye molecules [4]. Unfortunately, despite these approaches being powerful and error-proof, most of them are laborious, complex and time consuming, and they do not afford the necessary detectability and specificity towards the target.

In this context, biosensors offer several advantages over existing techniques (e.g., limited hands-on time, high-throughput screening, improved detectability, real-time analysis and label-free detection

methods and devices) [5]. However, to date, biosensor systems cannot detect bacteria at concentrations below 10 colony-forming units per milliliter (CFU/mL) without bacterial pre-enrichment of the sample. This is a crucial factor, since even a single cell may lead to serious health risk, so the research into bacterial biosensing aims to achieve ultrasensitive detection of infectious agents in complex biological matrices.

The integration of nanotechnology approaches into biosensors holds great promise for addressing the analytical needs of medical diagnostic systems [6–8]. In this context, nanoparticles (NPs) have raised great expectations with respect to generating enhanced signal-to-noise ratios, reducing response times and using them in multiplexed systems.

The use of NPs in biosensors is a relatively new area of research. Nevertheless, literature already shows numerous examples of incorporating NPs into biodevices [9–13]. So far, there are nanobiosensors for the specific detection of biologically-relevant molecules (e.g., nucleic acids [14], proteins [15] and enzymes [16]) and sometimes for the detection of infectious agents [17].

We provide an overview of recent advances in using NPs and implementing them in optical, electrochemical or magnetic biosensors for the detection of pathogenic bacteria (see Table 1). In particular, we focus on the development of novel NP-based technology that allows sensitive detection of bacteria in unprocessed and complex samples.

Finally, we outline the challenges that lie ahead. However, we do not include in this review other nanomaterials (e.g., nanowires, nanobelts and nanosheets) or novel nanotechnology-based methods for

Table 1. Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria

Transduction	Nanoparticle (NP)	NP function	Pathogen	LOD	Advantages	Ref.
Optical	Au NPs	Signal amplification	<i>E. coli</i>	58.2 ± 1.37 pg/mL	LOD decreased 5500-fold compared to that without Au NP	[25]
	Au-Ag NPs	Biosensing system	<i>S. aureus</i>	7 × 10 ⁵ CFU/mL	–	[28]
	Au NPs	Biosensing system	<i>S. aureus</i> enterotoxin B	0.1 ng/mL	–	[35]
	Au NPs	Biosensing systems	<i>B. subtilis</i> genomic DNA	2.5 fM	–	[36]
	Magnetic NPs	Biosensing system	<i>S. Enteritidis</i> insertion-element gene	1 ng/mL	–	[17]
	CdSe/ZnS core/shell dendron nanocrystals	Biosensing system	<i>E. coli</i> O157:H7	2.3 CFU/mL	More sensitive than similar published systems	[43]
	Dye-doped silica NPs	Biosensing system	<i>E. coli</i> O157:H7	1 CFU/mL	Assay time 30 min High sensitivity	[44]
	PAMAM-OH dendrimer	Signal amplification	<i>P. aeruginosa</i>	–	Assay time 20 min 350% sensitivity increase compared to that without PAMAM-OH	[45]
	PAMAM-NH ₂ dendrimer	Signal amplification	<i>E. coli</i>	1 × 10 ⁴ CFU/mL	–	[46]
	Liposome	Signal amplification	RNA sequences from <i>B. anthracis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>E. coli</i>	10–1000 fmoL	Universal system	[49]
Magnetic	Superparamagnetic NPs	Biosensing system	<i>E. coli</i> nucleic acid <i>Salmonella</i> antibiotic-resistant genes	4–250 pM	Assay time 3 min	[50]
	Superparamagnetic NPs	Biosensing system	<i>E. coli</i> O157:H7	1 × 10 ⁵ CFU/mL	Minimized noise and interferences Long-term stability	[51]
	Paramagnetic NPs	Biosensing system	<i>E. coli</i>	10 CFU/mL	More sensitive than biosensors based on the self-assembled multilayer system	[53]
	Magnetic NPs	Biosensing system	<i>S. aureus</i>	1 × 10 ³ CFU/mL	Measurements of turbid samples with no preparation steps Sample volumes (5–10 µL) Assay time 15 min	[54]
	Electrochemical	Au NP-modified screen-printed carbon electrodes	Signal amplification	<i>E. coli</i> O157:H7	6 CFU/strip	–
	Pt NP-coated gold nanoporous film	Signal amplification	<i>E. coli</i>	10 CFU/mL	No sample pretreatment	[56]
	Au NP-based graphite epoxy composite	Signal amplification	<i>Salmonella</i> sp. ssDNA	9 fmoL	Novel material with improved properties	[57]
	Polyaniline-coated magnetic NPs	Biosensing system	<i>B. anthracis</i> endospores	4.2 × 10 ² CFU/mL	Assay time 16 min	[60]
	Potassium ferrocyanide-encapsulated liposomes	Biosensing system	<i>Cholera</i> toxin	10 ⁻¹⁵ g/mL	–	[61]
	Magnetic NP-coated carbon-nanotube nanocomposite	Biosensing system	<i>E. coli</i>	10 CFU/mL	–	[62]
	Nanogold/chitosan-multi-walled carbon nanotubes	Biosensing system	<i>S. aureus</i> enterotoxin B	0.5 ng/mL	–	[64]
	Single-walled carbon nanotubes	Biosensing system	<i>S. infantis</i>	100 CFU/mL	Assay time 1 h Label-free system	[65]
	Single-walled carbon nanotubes	Biosensing system	<i>E. coli</i>	–	Assay time < 20 min	[65]

Miniaturization	Au NPs Au-Ag NPs Liposome	Signal amplification	<i>E. coli</i> oligonucleotides	5 fM	Improved sensitivity compared to similar methods	[66] [67] [75]
		Signal amplification Mediator	<i>E. coli</i> and <i>B subtilis</i> <i>L. monocytogenes</i>	100 CFU/sample 5×10^5 CFU/mL	- - -	

detection and identification of bacterial pathogens (e.g., surface-enhanced Raman spectroscopy [18], microarrays [19], matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [20], NP-based biosays [21] and fluorescence/electron microscopy [22]).

2. Optical

Optical-affinity biosensors based on surface-plasmon resonance (SPR) allow label-free qualitative and quantitative measurements of biomolecular interactions between a biomolecule immobilized on a metal surface and the analyte in solution [23]. The SPR effect occurs when the incident photon frequency is resonant with the oscillation of the electron-density waves formed at the interface of a metal (i.e. gold) and a dielectric (i.e. glass). When the analyte interacts with the molecule immobilized on the metal surface, a surface-plasmon perturbation occurs and generates changes in the refractive index at the metal and dielectric interface.

Despite being such a powerful technique, the sensitivity of SPR biosensors is sometimes limited by inability to measure small changes in refractive index. In this context, gold NPs (AuNPs) have demonstrated their potential to amplify SPR detection [24]. Thus, Joung et al. employed AuNPs in a signal-amplification method for high-sensitivity detection of *Escherichia coli* 16S rRNA using peptide nucleic-acid probes with an SPR biosensor system [25].

When the conductive metal surface of an SPR sensor is substituted by noble-metal NPs, the light that interacts with the particles has much smaller dimensions than the incident wavelength, which leads to a plasmon that oscillates locally around the NP with a frequency known as the localized SPR (LSPR). The LSPR spectrum of metal NPs is characterized by the presence of intense adsorption and scattering peaks, which greatly improves the sensitivity of the sensors [26,27]. An example of this is the work of Zhu and co-workers, who developed an LSPR-effect-based biosensor with a hybrid Au-Ag NP array for *Staphylococcus aureus* enterotoxin B detection [28]. The LSPR biosensor directly detects enterotoxin B at the ng/mL level, while other SPR biosensors for enterotoxin B require amplification steps to achieve this sensitivity [29].

Microorganism-DNA identification is without doubt a very selective approach to identifying bacteria, although amplification of the genetic material is necessary. PCR-based amplification techniques [quantitative real time PCR and variants of it (e.g., reverse transcription PCR)] have become standard methodologies for the detection of nucleic acids, but are not convenient for point-of-care (PoC) applications, where speed is critical and the enzymatic constraints and cost of PCR are limiting.

The recently developed bio-barcode assay approach [30,31] provides amplification in addition to the possibility of simultaneously detecting many different targets in one sample [32,33]. The method relies on a two-component biofunctionalized AuNPs, a ds or ss DNA bio-barcode and the bioreceptor (e.g., antibody or oligonucleotide) and single-component modified magnetic microparticles (MMPs) containing another bioreceptor able to bind the target analyte. Once binding of the two particles has occurred through forming a sandwich with the target, the complexes are separated with the aid of a magnet and the DNA bio-barcode is released and detected using a chip-based detection method and Ag-enhanced AuNPs [31] or a fluorophore bound to the bio-barcode [34]. Using this method, Hill and co-workers reported the detection of *Bacillus subtilis* double-stranded genomic DNA at a 2.5-fM concentration [35] (see Fig. 1). Similarly, Zhang et al. recently developed a fluorescent bio-barcode DNA assay for the detection of *Salmonella enteritidis* with a limit of detection (LOD) of 0.2 fM [36]. Recently, this type of assay has been adapted to a microfluidic chip-based format, an important step toward automation [37].

A significant number of optical biosensors for detecting bacteria are based on the measurement of the fluorescence emission of organic dyes [38,39] or protein-based fluorophores [40]. However, common fluorophores have major disadvantages (e.g., poor photostability and low intensity) and they are not optimized for multi-color applications. QDs may overcome these limitations, since

they are photostable, exhibit high quantum yield and show size-tunable and composition-tunable emission spectra, thus allowing the simultaneous identification of multiple samples.

The capability of quantum dots (QDs) to enhance assay sensibility compared to traditional organic dyes (e.g., fluorescein isothiocyanate) was demonstrated in a simple fluorometric assay for the *E. coli* O157:H7 serotype [41]. Similarly, Edgar et al. reported a method that combined in vivo biotinylation of engineered host-specific bacteriophage and conjugation of the phage to streptavidin-coated QDs [42]. The method provides specific detection of *E. coli* among several different bacterial cells and as few as 10 CFU/mL in experimental samples. Despite QD's potential, to date there are few examples in the literature that illustrate the application of these NPs to biosensors. In the context of bacteria detection, Liu et al. have reported the development of a biosensor system based on a flowing chamber with a microporous immunofilter for capturing *E. coli* O157:H7 and QD dendron nanocrystals as fluorescent labels [17]. Using this biosensor system the LOD achieved was as low as 2.3 CFU/mL.

Apart from metallic NPs and QDs, other NP-based strategies for optical biosensing of bacteria have been employed to amplify the transduction of biomolecular interactions. For example, Mechery et al. have used a fluorescence-detection system based on dye-doped silica NPs, which provided significant signal amplification in *E. coli* O157:H7 antibody-antigen recognition [43].

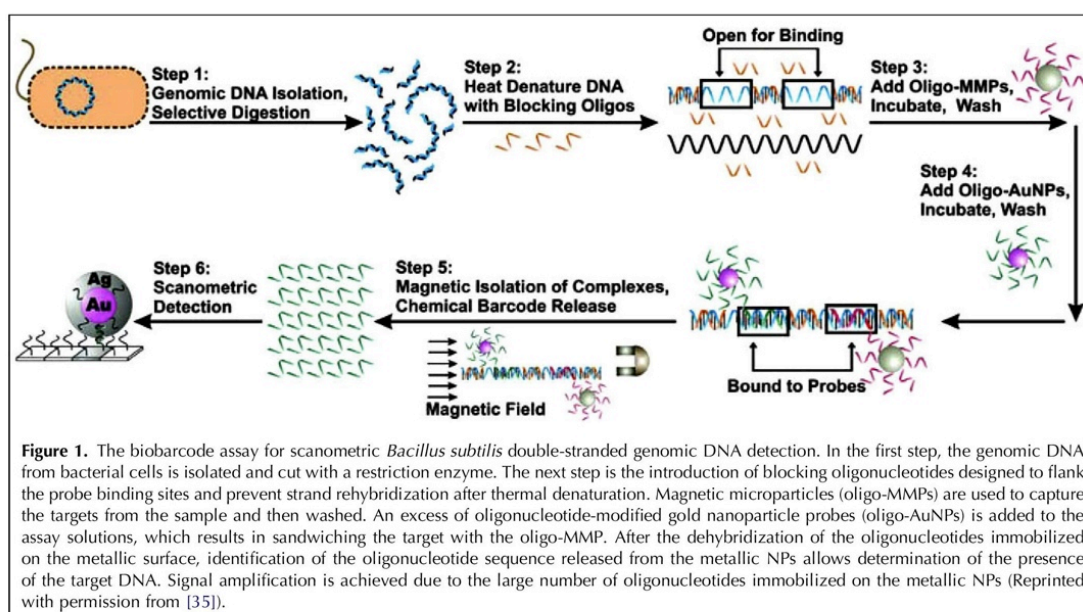
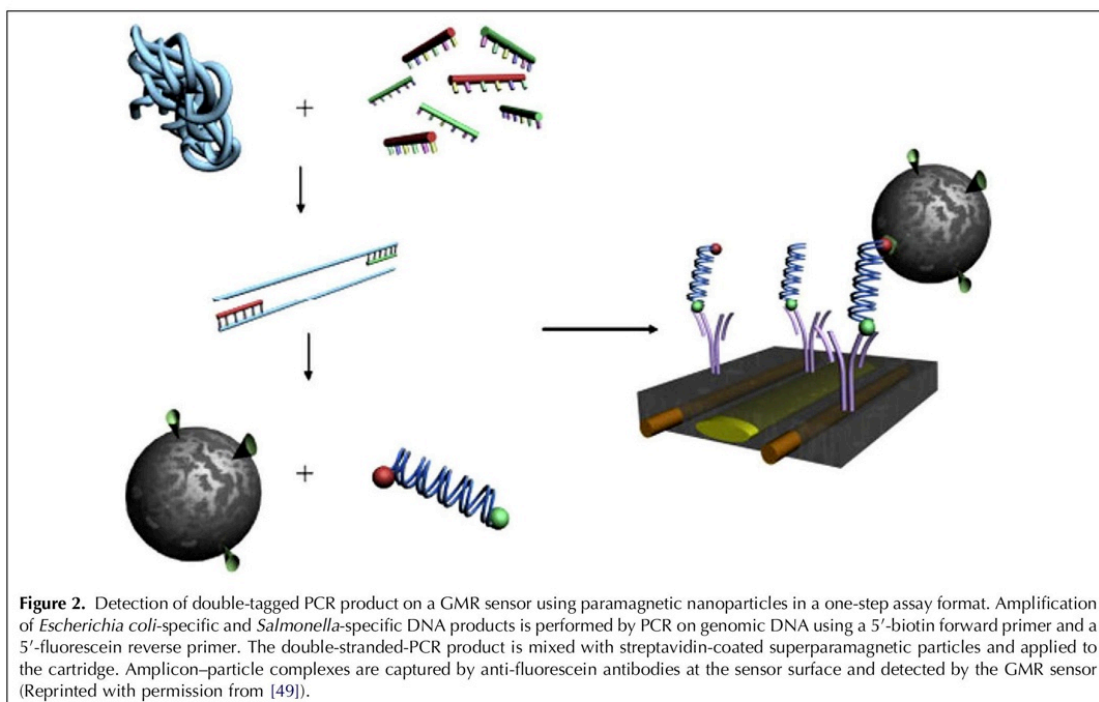


Figure 1. The biobarcode assay for scanometric *Bacillus subtilis* double-stranded genomic DNA detection. In the first step, the genomic DNA from bacterial cells is isolated and cut with a restriction enzyme. The next step is the introduction of blocking oligonucleotides designed to flank the probe binding sites and prevent strand rehybridization after thermal denaturation. Magnetic microparticles (oligo-MMPs) are used to capture the targets from the sample and then washed. An excess of oligonucleotide-modified gold nanoparticle probes (oligo-AuNPs) is added to the assay solutions, which results in sandwiching the target with the oligo-MMP. After the dehybridization of the oligonucleotides immobilized on the metallic surface, identification of the oligonucleotide sequence released from the metallic NPs allows determination of the presence of the target DNA. Signal amplification is achieved due to the large number of oligonucleotides immobilized on the metallic NPs (Reprinted with permission from [35]).



Chang and co-workers have demonstrated a 350% enhancement of the detectability of live *Pseudomonas aeruginosa* using a fourth-generation hydroxy-terminated polyamidoamine (PAMAM) dendrimer film in an optical biosensor [44]. Similarly, fourth-generation amine-terminated PAMAM dendrimers containing embedded membrane-reactive fluorophores have been used to improve the detection of *E. coli* and *Bacillus subtilis* [45]. Liposomes entrapping fluorophore sulforhodamine B have also been employed to amplify the detection of RNA sequences from *B. anthracis*, *Cryptosporidium parvum* and *E. coli* at 10–1000 nM concentrations [46].

3. Magnetic

Magnetic particles were traditionally used for concentration, separation, purification and identification of molecules and specific cells. In recent years, the magnetic properties of some NPs have also been used as labels in biosensing [47,48]. One example is the work by Koets et al., who developed a magneto-resistant sensor using superparamagnetic particles as detection labels for *E. coli* and *Salmonella*. Magnetic NPs detected by a Giant Magneto Resistance (GMR) sensor were shown to be very powerful, since the magnetic particles speed up the

assay by reducing diffusion limitations. Moreover, the absence of magnetic materials in biological samples means that background signals are low. In this work, purified genomic bacterial DNA was used as a template for PCR using a 5'-biotin forward primer and a 5'-fluorescein reverse primer. The double-stranded-PCR product was then mixed with streptavidin-coated superparamagnetic particles. Finally, the particle complexes were captured by anti-fluorescein antibodies and detected with the GMR platform [49] (see Fig. 2). Using this biosensor, 4–250 pM amplicon concentrations were detected using a one-step format with total assay times of less than 3 min.

Several immunomagnetic biosensors have been developed for label-free detection of *E. coli*. For example, Mujika et al. reported a magneto-resistive immunosensor for the analysis of *E. coli* O157:H7 in food and clinical samples. This biosensor was capable of detecting and quantifying small magnetic field variations caused by the presence of superparamagnetic beads bound to the antigens previously immobilized on the sensor surface via an antibody-antigen reaction [50]. In this same context, Maalouf and co-workers described an immunomagnetic biosensor for *E. coli* comprising streptavidin-functionalized paramagnetic nanobeads attracted to a gold-electrode surface via a magnetic field. Biotinylated-anti *E. coli* antibodies then interacted with

the nanobeads. Detection was in this case by impedimetric measurements yielding a working range of $10\text{--}10^3$ CFU/mL [51].

Liebana et al. recently reported applying immunomagnetic separation/double-tagging PCR/electrochemical magneto-genosensing to detect *Salmonella* in skimmed-milk samples with an LOD of 1 CFU/mL. In this methodology, *Salmonella* are captured from milk and preconcentrated by immunomagnetic separation. The bacteria attached to the magnetic beads are then lysed and the genomic DNA is thus released. The amplification of the genetic material with a double-tagging set of primers is then performed to confirm the identity of the bacteria by electrochemical magneto-genosensing [52]. In another example, Lee et al. showed sensitive, rapid detection of *S. aureus* using a novel miniaturized diagnostic magnetic resonance system and magnetic NPs to amplify molecular interactions [53].

4. Electrochemical

In recent years, electrochemical biosensors have taken advantage of the large surface areas of NPs, favorable electronic properties and electrocatalytic activity to improve their speed, selectivity and detectability [9]. The applications of NPs in electrochemical biosensors can be found in two categories:

- novel electrochemical transducers that show enhanced biomolecule immobilization, low background current and improved electrochemistry; and,
- labels for signal amplification of biorecognition events.

There are many examples in the literature of novel NP-based materials for electrochemical biosensing (e.g., screen-printed carbon electrodes modified with AuNPs display a 13.1-fold increase in detecting *E. coli* O157:H7 compared to traditional screen-printed carbon electrodes, with a working range of $10^2\text{--}10^7$ CFU/mL [54]). Similarly, this bacterium has been detected with platinum-coated gold nanoporous electrodes with an LOD of 10 CFU/mL [55]. Another example is a rigid conducting gold nanocomposite, which has shown excellent transducing properties, as demonstrated in the detection of *Salmonella* at pM levels [56].

Electrically-active polyaniline-coated magnetic NPs have been employed as a magnetic concentrator and biosensor transducer in one system to detect *B. anthracis* spores from food matrices [57]. In this same context, carbon-nanotube (CNT)-based electrochemical transducers offer substantial improvements in performance compared to traditional electrodes. CNTs' exceptional properties (e.g., small size, great strength, high electrical and thermal conductivity, and large specific surface area) make them excellent amplification platforms to increase the number of signal-generating molecules [58,59].

Examples of CNT applications in bacteria biosensing include the work of Viswanathan et al., who used liposome-coated CNTs for electrochemical detection of the cholera toxin at ultratrace levels (10^{-16} g) [60]. *E. coli* was determined with an LOD of 10 CFU/mL using a tyrosinase biosensor to determine phenol, by employing Fe_3O_4 magnetic NP-coated CNTs. The detection principle was based on determination of the phenol produced by an enzymatic reaction in the bacteria-containing solution [61]. Using horseradish peroxidase-labeled *S. aureus* enterotoxin B antibodies immobilized onto nanogold/chitosan-multi-walled CNTs, *S. aureus* enterotoxin B was detected with a conductometric immunobiosensor in the linear range 0.5–83.5 ng/mL [62].

Field-effect transistors (FETs) fabricated using semiconducting single-walled CNTs can monitor a direct charge-transfer reaction between the analyte and the CNT. The CNT structure allows the accumulation of carriers in the bulk of the nanodiameter structure and increases the sensitivity to the point that single-molecule detection is possible [63]. An example of the application of FETs in bacteria detection is the work of Vilamizar et al., who reported the development of CNT-FET for the detection of *S. infantis* at 100 CFU/mL in 1 h [64]. Similarly, *E. coli* has been detected using an aptamer-functionalized CNT-FET [65].

Within NPs used as electrochemical-sensor labels, metallic NPs have demonstrated excellent properties for anodic stripping-based electrochemical methods, since dissolution of the NPs significantly enhances the signal by generating thousands of detectable metal ions per biorecognition event. Anodic stripping voltammetry (ASV) based on latex/AuNPs was employed to detect *E. coli* DNA with an LOD of 0.5 fM [66] (see Fig. 3). Despite the sensitivity provided by NPs in electrochemical stripping, one of their main drawbacks is high background signals. A strategy to avoid high background involves the electrocatalytic deposition of silver metal onto the AuNPs. This has been demonstrated in a sensor for DNA detection of *E. coli* and *B. subtilis* [67]. Another possibility to overcome high background is to control metal-ion precipitation enzymatically. Thus, Fanjul-Bolado and co-workers have used alkaline phosphatase for the detection of *Streptococcus pneumoniae* by ASV with a 14-fold increase in sensitivity compared with direct voltammetric detection [68].

Semiconductor NPs have demonstrated their potential for enhanced electrochemical detection of DNA hybridization [69], electrical coding of single-nucleotide polymorphisms [70], and protein and small-molecule detection [71]. Furthermore, semiconductor NPs offer the electrodiverse population of electrical tags needed for multiplexed bioanalysis. In this context, Liu et al. developed a rapid coding system for single-nucleotide polymorphisms using QDs of diverse composition (ZnS, CdS, PbS, CuS), which provided different potential vol-

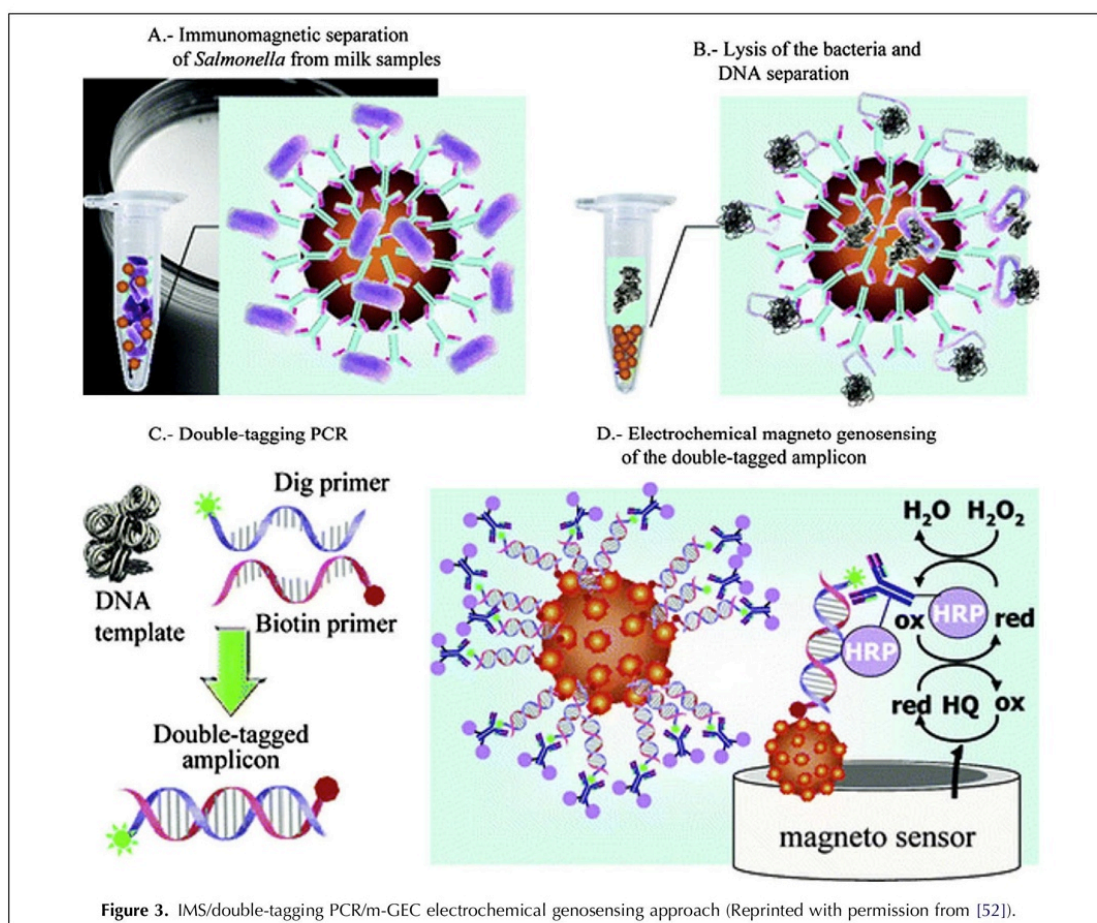


Figure 3. IMS/double-tagging PCR/m-GEC electrochemical genosensing approach (Reprinted with permission from [52]).

tammetric signatures [70]. Each QD was functionalized with a different mononucleotide. Via base pairing, the NP conjugates interacted with the mismatch in the target, yielding a distinct electronic fingerprint that reflected the identity of the mismatch. These same authors developed similar detection system using cadmium-phosphate-loaded apoferritin NPs instead of QDs [72].

Similarly, Wang and collaborators exploited the electrodiversity provided by QDs of diverse composition for the simultaneous detection of multiple-DNA targets at fM level [73]. QD-based electrochemical-stripping transduction has also been used for multiplexed protein assays (e.g., the QD-aptamer-based method for the dual detection of thrombin and lysozyme at attomole limits [74]).

Despite the potential that semiconductor-NP-based electrochemical biosensors have demonstrated regarding sensitivity and multiplexity, there are no examples in the literature of their application to bacteria detection.

Liposomes have been used in a novel approach for specifically detecting *Listeria monocytogenes* in the concentration range 5×10^5 – 2×10^7 CFU/mL [75]. In this approach, an electrochemical mediator is encapsulated in liposomes, which can be disrupted by the hemolytic action of some bacteria. As a result, the liposome-entrapped mediator is released and subsequently reduced by the electron-transport system of the bacteria to allow electrochemical detection. The electrical signal from the working electrode of the sensor should be proportional to the concentration of hemolytic bacteria in a given sample.

5. Microgravimetry

A quartz crystal microbalance (QCM) is a sensitive mass-measuring sensor, in which a mass increase on a gold-electrode surface is reflected in a decrease of the

resonance frequency of the crystal, with the frequency shift correlating with the analyte concentration. QCM detection of *E. coli* has already been demonstrated [76,77].

It has been shown that incorporating AuNPs in QCM sensors significantly amplifies the signal, thereby improving the sensitivity. An example is the work by Wang and co-workers, who reported an AuNP-amplified QCM DNA sensor for *E. coli* O157:H7 detection. In this study, AuNPs were immobilized on the surface of the

QCM to absorb more single-stranded DNA probes, which then captured the biotinylated *E. coli* DNA. After that, a second amplification step was performed using outer avidin-coated AuNPs [78] (see Fig. 4). This method allowed an LOD of 2.0×10^3 CFU/mL, demonstrating improved performance compared to traditional QCM [76,77].

Similarly, Mao et al. developed a QCM DNA sensor based on an NP-amplification method for detecting *E. coli* O157:H7. In this study, streptavidin-conjugated

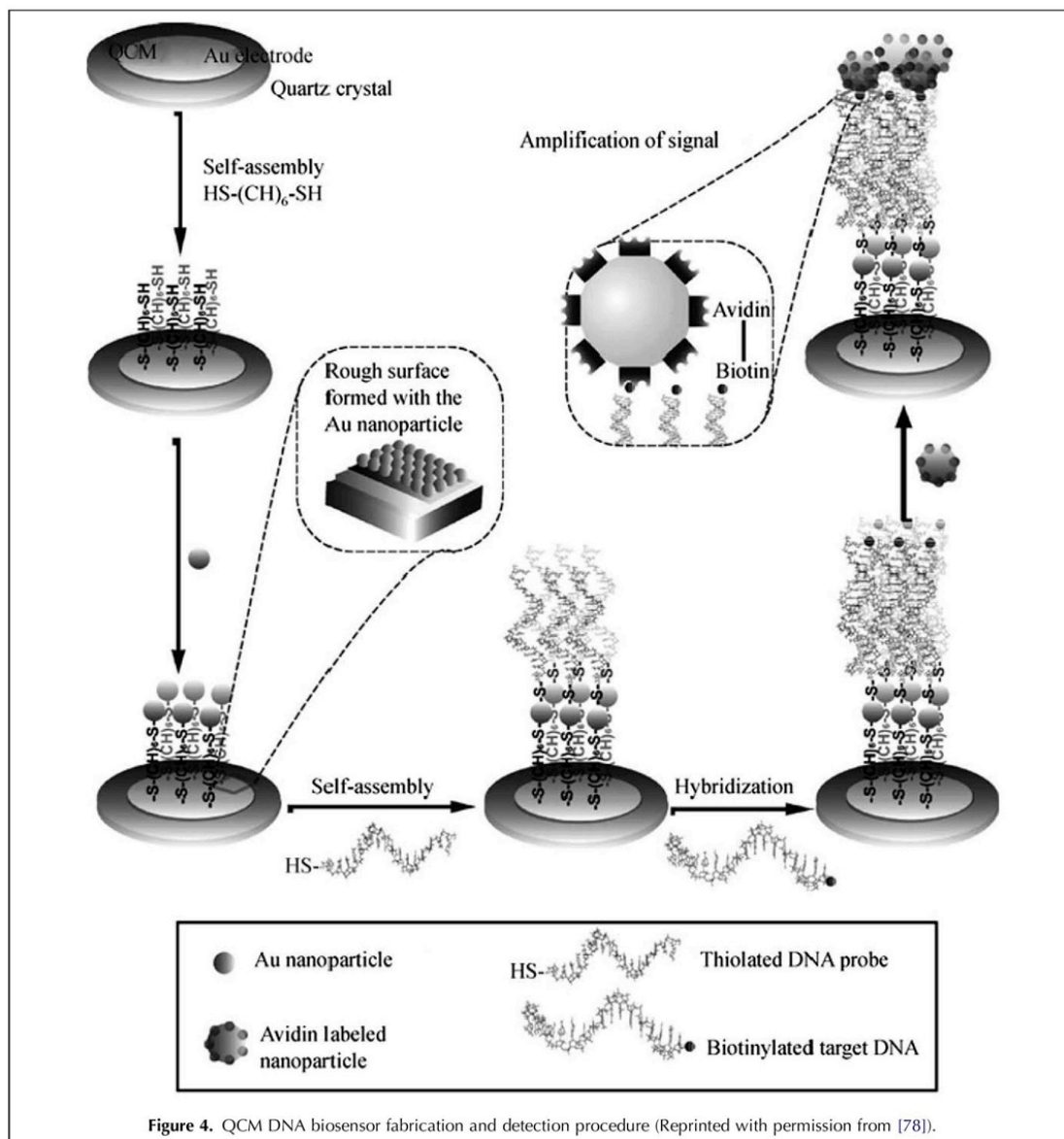


Figure 4. QCM DNA biosensor fabrication and detection procedure (Reprinted with permission from [78]).

Fe₃O₄ NPs were used as mass enhancers to amplify the frequency change and the LOD was 2.67×10^2 CFU/mL [79].

6. Conclusions and future trends

The biosensor field is evolving to develop cost-effective portable devices with higher sensitivity and easier usage, and to be capable of multiplexed and continuous monitoring. These challenges are of great importance for bacteria identification and detection, since the achievement of ultrasensitive detection, pushing sensitivity towards single-molecule LOD, is critical to prevent pathogenic infections and pandemics. In this context, NP-based biosensors offer excellent prospects to enhance sensitivity and to provide simultaneous detection of multiple targets. NPs amplify biomolecular recognition events due to their large surface-volume ratio, which increases the amount of biomolecules immobilized onto the surface and, in turn, maximizes the number of binding events. As a result, NPs afford an enormous signal enhancement, which, coupled to the high sensitivity of optical or electrochemical transducers, sets the basis of ultrasensitive detection. For example, incorporating CdSe/Zn dendron nanocrystals in a porous membrane immunofilter-based biosensor improved the LOD of *E. coli* O157:H7 to 2.3 CFU/mL, which is much lower than other membrane-based, on-line, optical analysis systems [17]. Similarly, integrating paramagnetic NPs into the gold-electrode surface of an immunomagnetic biosensor improved *E. coli* detection compared to other self-assembled multilayer systems [51]. Another example is the work by Joung et al., in which AuNP amplification in an SPR biosensor afforded a 5500-fold decrease in the LOD of *E. coli* 16s rRNA [25].

NPs also possess encoding capabilities, as it is possible to tailor their physical properties by varying their size, shape and composition. Preliminary NP-based studies have achieved multi-detection of pathogenic bacteria. Li and co-workers have employed DNA-based fluorescence nanobarcodes for the multiplexed detection of *B. anthracis*, Ebola and SARS DNA with attomole sensitivity [32].

Similarly, Wang et al. have selectively tagged *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. aureus* with dye-doped silica NPs [80].

QDs with different sizes [81] and gold nanorods with different aspect ratios [82] have also been investigated to detect simultaneously *E. coli* and *S. typhimurium*.

These works are the first stage in using NPs to detect a wide range of pathogens simultaneously. To date, multiplexed bacteria detection has been achieved only by direct measurement of doped water/buffered samples using fluorescence microscopy, flow cytometry and UV/visible absorption spectroscopy. However, applying NPs

to achieve multiple bacteria identification using biosensors has not yet been demonstrated.

Future developments in the biosensor field should also integrate microfluidics and micro-optical components to locate sample processing and particle interrogation in a single hand-held device, which permits on-site analysis of samples. Magnetic and non-magnetic NPs provide the opportunity for manipulating targets and reagents within microfluidic devices for automated sample processing, which will help to detect bacteria cells within complex samples. One example is the work by Lee et al. [53], who showed that incorporating magnetic NPs in a miniaturized diagnostic magnetic resonance system allowed sensitive, quantitative and rapid analysis of unprocessed *S. aureus*. Along the same lines, Merchery et al. developed a portable flow-channel, optical-detection system combined with bioconjugated luminescent NPs that allows detection of single *E. coli* O157:H7 cells without sample enrichment [43].

This new NP-based technology therefore shows promise for developing easy-to-use and low-cost devices for PoC use.

Acknowledgements

This work has been funded by the Spanish Ministries of Industry, Tourism and Trade (Contract number TSI-020100-2008-494) and Science and Innovation (Contract number EUI2008-00175) and the Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN) through the MICROPLEX intramural project. The AMR group is a *Grup de Recerca de la Generalitat de Catalunya* and has support from the *Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya* (Expedient 2005SGR 00207).

References

- [1] C. Burtcher, S. Wuertz, Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 4618.
- [2] M.J. Allen, S.C. Edberg, D.J. Reasoner, Int. J. Food Microbiol. 92 (2004) 265.
- [3] E. Van Dyck, M. Ieven, S. Pattyn, L. Van Damme, M. Laga, J. Clin. Microbiol. 39 (2001) 1751.
- [4] B. Regnault, S. Martin-Delautre, M. Lejay-Collin, M. Lefèvre, P.A. Grimont, Res. Microbiol. 151 (2000) 521.
- [5] P.D. Skottrup, M. Nicolaisen, A.F. Justesen, Biosens. Bioelectron. 24 (2008) 339.
- [6] N. Sanvicens, M.-P. Marco, Trends Biotechnol. 26 (2008) 425.
- [7] J.W. Choi, B.K. Oh, Y.K. Kim, J. Min, J. Microbiol. Biotechnol. 17 (2007) 5.
- [8] K.K. Jain, Clin. Chem. 53 (2007) 2002.
- [9] A. Merkoçi, FEBS J. 274 (2007) 310.
- [10] F.S. Ligler, Anal. Chem. 81 (2009) 519.
- [11] K. Balasubramanian, M. Burghard, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 452.
- [12] O.A. Sadik, A.O. Aluoch, A. Zhou, Biosens. Bioelectron. 24 (2009) 2749.

- [13] E. Palecek, M. Fojta, *Talanta* 74 (2007) 276.
- [14] I.K. Litos, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos, J. Traeger-Synodinos, E. Kanavakis, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3135.
- [15] J. Hu, P.C. Zheng, J.H. Jiang, G.L. Shen, R.Q. Yu, G.K. Liu, *Anal. Chem.* 81 (2009) 87.
- [16] S. Hong, I. Choi, S. Lee, Y.I. Yang, T. Kang, J. Yi, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1378.
- [17] Y. Liu, R. Brandon, M. Cate, X. Peng, R. Stony, M. Johnson, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8796.
- [18] W.R. Premasiri, D.T. Moir, M.S. Klempner, N. Krieger, G.N. Jones, L.D. Ziegler, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 312.
- [19] J.R. Shepard, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2478.
- [20] J.C. Liu, P.J. Tsai, Y.C. Lee, Y.C. Chen, *Anal. Chem.* 80 (2008) 5425.
- [21] X.J. Zhao, L.R. Hilliard, S.J. Mechery, Y.P. Wang, R.P. Bagwe, S.G. Jin, W.H. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 15027.
- [22] K. El-Boubbou, C. Gruden, X. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 13392.
- [23] X.D. Hoa, A.G. Kirk, M. Tabrizian, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 151.
- [24] J. Wang, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 109 (2008) 239.
- [25] H.A. Joung, N.R. Lee, S.K. Lee, J. Ahn, Y.B. Shin, H.S. Choi, C.S. Lee, S. Kim, M.G. Kim, *Anal. Chim. Acta* 630 (2008) 168.
- [26] J.N. Anker, W.P. Hall, O. Lyandres, N.C. Shah, J. Zhao, R.P. Van Duyne, *Nat. Mater.* 7 (2008) 442.
- [27] M.P. Kreuzer, R. Quidant, G. Badenes, M.-P. Marco, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1345.
- [28] S. Zhu, C. Du, Y. Fu, *Opt. Mat.* 31 (2009) 1608.
- [29] A. Naimushin, S.D. Soelberg, D.K. Nguyen, L. Dunlap, D. Bartholomew, J. Elkind, J. Melendez, C.E. Furlong, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 573.
- [30] J.-M. Nam, S.-J. Park, C.A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 3820.
- [31] J.-M. Nam, S.I. Stoeva, C.A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5932.
- [32] Y. Li, Y.T. Cu, D. Luo, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 885.
- [33] S.I. Stoeva, J.-S. Lee, J.E. Smith, S.T. Rosen, C.A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 8378.
- [34] O. Byung-Keun, N. Jwa-Min, L. Seung Woo, A.M. Chad, *Small* 2 (2006) 103.
- [35] H.D. Hill, R.A. Vega, C.A. Mirkin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 9218.
- [36] D. Zhang, D.J. Carr, E.C. Alocilja, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1377.
- [37] E.D. Goluch, J.M. Nam, D.G. Georganopoulou, T.N. Chiesl, K.A. Shaikh, K.S. Ryu, A.E. Barron, C.A. Mirkin, C. Liu, *Lab Chip* 6 (2006) 1293.
- [38] S. Ko, S.A. Grant, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1283.
- [39] T. Curtis, R.M. Naal, C. Batt, J. Tabb, D. Holowka, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1024.
- [40] J.M. Simpson-Stroot, E.A. Kearns, P.G. Stroot, S. Magaña, D.V. Lim, *J. Microbiol. Methods* 72 (2008) 29.
- [41] M.A. Hahn, J.S. Tabb, T.D. Krauss, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4861.
- [42] R. Edgar, M. McKinstry, J. Hwang, A.B. Oppenheim, R.A. Fekete, G. Giulian, C. Merrill, K. Nagashima, S. Adhya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 4841.
- [43] S.J. Mechery, X.J. Zhao, L. Wang, L.R. Hilliard, A. Munteanu, W. Tan, *Chem. Asian J.* 1 (2006) 384.
- [44] A.C. Chang, J.B. Gillespie, M.B. Tabacco, *Anal. Chem.* 73 (2001) 467.
- [45] J. Ji, J.A. Schanzle, M.B. Tabacco, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1411.
- [46] A.J. Baumner, C. Jones, C.Y. Wong, A. Price, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1587.
- [47] W. Shen, B.D. Schrag, M.J. Carter, G. Xiao, *Appl. Phys. Lett.* 93 (2008) 033903.
- [48] T.J. Lowery, R. Palazzolo, S.M. Wong, P.J. Prado, S. Taktak, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1118.
- [49] M. Koets, T. van der Wijk, J.T.W.M. van Eemeren, A. van Amerongen, M.W.J. Prins, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1893.
- [50] M. Mujika, S. Arana, E. Castaño, M. Tijero, R. Vilares, J.M. Ruano-López, A. Cruz, L. Sainz, J. Berganza, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1253.
- [51] R. Maalouf, W.M. Hassen, C. Fournier-Wirth, J. Coste, N. Jaffrezic-Renault, *Microchim. Acta* 163 (2008) 157.
- [52] S. Liébana, A. Lermo, S. Campoy, J. Barbé, S. Alegret, M.I. Pividori, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5812.
- [53] H. Lee, E. Sun, D. Ham, R. Weissleder, *Nat. Med.* 14 (2008) 869.
- [54] Y.H. Lin, S.H. Chen, Y.C. Chuang, Y.C. Lu, T.Y. Shen, C.A. Chang, C.S. Lin, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1832.
- [55] Q. Yang, Y. Liang, T. Zhou, G. Shi, L. Jin, *Electrochem. Comm.* 11 (2009) 893.
- [56] P.R. Marques, A. Lermo, S. Campoy, H. Yamanaka, J. Barbé, S. Alegret, M.I. Pividori, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1332.
- [57] S. Pal, E.C. Alocilja, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1437.
- [58] N. Sinha, J. Ma, J.T. Yeow, J. Nanosci. Nanotechnol. 6 (2006) 573.
- [59] J. Wang, *Analyst* (Cambridge, UK) 130 (2005) 421.
- [60] S. Viswanathan, L.C. Wu, M.R. Huang, J.A. Ho, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1115.
- [61] Y. Cheng, Y. Liu, J. Huang, K. Li, Y. Xian, W. Zhang, L. Jin, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 2588.
- [62] Z.G. Chen, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 31 (2007) 345.
- [63] G. Gruner, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 322.
- [64] R.A. Villamizar, A. Maroto, F.X. Rius, I. Inza, M.J. Figueras, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 279.
- [65] H.M. So, D.W. Park, E.K. Jeon, Y.H. Kim, B.S. Kim, C.K. Lee, S.Y. Choi, S.C. Kim, H. Chang, J.O. Lee, *Small* 4 (2008) 197.
- [66] S. Pinijsuwan, P. Rijiravanich, M. Somasundrum, W. Sura-reungchai, *Anal. Chem.* 80 (2008) 6779.
- [67] S.W. Yeung, T.M. Lee, H. Cai, I.M. Hsing, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) e118.
- [68] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, M.B. González-García, A. Costa-García, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5272.
- [69] H. Cai, N.N. Zhu, Y. Jiang, P.G. He, Y.Z. Fang, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 1311.
- [70] G.D. Liu, T.M.H. Lee, J.S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 38.
- [71] F. Wang, S. Hu, *Microchim. Acta* 165 (2009) 1.
- [72] G.D. Liu, Y.H. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 10394.
- [73] J. Wang, G.D. Liu, A. Merkoci, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 3214.
- [74] J.A. Hansen, J. Wang, A.N. Kawde, Y. Xiang, K.V. Gothelf, G. Collins, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2228.
- [75] H.J. Kim, H.P. Bennetto, M.A. Halablab, C. Choi, S. Yoon, *Sens. Actuators B* 119 (2006) 143.
- [76] X.L. Su, Y. Li, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 563.
- [77] V.C. Wu, S.H. Chen, C.S. Lin, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2967.
- [78] L.J. Wang, Q.S. Wei, C.S. Wu, Z.Y. Hu, J. Ji, P. Wang, *Chin. Sci. Bull.* 53 (2008) 1175.
- [79] X. Mao, L. Yang, X.L. Su, Y. Li, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1178.
- [80] L. Wang, W. Zhao, M.B. O'Donoghue, W. Tan, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 297.
- [81] L. Yang, Y. Li, *Analyst* (Cambridge, UK) 131 (2006) 394.
- [82] C. Wang, J. Irudayaraj, *Small* 4 (2008) 2204.

2 Marc d'investigació, objectius i estructura de la tesi

2.1 L'AUTORA I EL GRUP D'INVESTIGACIÓ

La doctoranda i autora d'aquesta tesi doctoral, Carme Pastells, és llicenciada en química per la Universitat de Barcelona (2009), i posteriorment va cursar el màster avançat en química orgànica de mateixa Universitat de Barcelona. Al 2011, gràcies a una beca FI de la Generalitat de Catalunya, va iniciar els seus estudis de doctorat en el grup Nb4D (*Nanobiotechnology for Diagnostic*, anteriorment anomenat AMRg, *Applied Molecular Receptor group*). El grup pertany al Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC) i està ubicat a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC) de Barcelona. El grup també forma part del Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), creació liderada per l'Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

El grup Nb4D, liderat per la Prof. M.-Pilar Marco s'ha focalitzat en el desenvolupament de nous mètodes de diagnòstic molecular per cobrir les actuals limitacions en l'àmbit clínic i la seguretat alimentària. La investigació que es du a terme està en la interfície de la química i la biologia, combinant en molts casos conceptes de nanotecnologia.

2.2 PROJECTES D'INVESTIGACIÓ

El treball d'aquesta tesi doctoral s'ha desenvolupat en el context de tres projectes d'investigació consorciats amb altres grups d'investigació:

1. **Microplex**, Micro/nanotecnologías para la inmunodetección multiplexada de microorganismos patógenos. Projecte intramural CIBER-BBN. 2008
2. **NanoMeDiag**, Nanobioanalytical platforms for improved medical diagnosis of infections caused by pathogens. MICINN (EUI2008-00175). 2009-2011
3. **NanoBioSepRes**, Design and evaluation of a novel impedimetric immunosensor for the diagnosis of sepsis of respiratory origin due to *Pseudomonas aeruginosa*. Projectes de col·laboració multidisciplinaris CIBER-BBN – CIBERES – SEPAR.

Els tres projectes se centren en el desenvolupament de noves metodologies per a la detecció de microorganismes patògens per tal de suplir les actuals mancances del mètodes que disposen els hospitals i els laboratoris clínics. En tots ells, hi ha un

objectiu general comú: el desenvolupament d'una nova eina de diagnòstic que sigui ràpida i específica pel microorganisme en concret, fàcil d'implementar i de baix cost.

El projecte Microplex va ser el primer projecte amb què el grup Nb4D va obrir aquesta línia d'investigació en el camp de la detecció de microorganismes. En aquest projecte es varen abordar els primers estudis bibliogràfics per definir els patògens de més rellevància en el camp de les malalties infeccioses, tenint especialment presents les malalties nosocomials. Inicialment amb el projecte Microplex, i a continuació amb projecte NanoMeDiag, es varen abordar la producció dels primers anticossos policlonals contra bacteries i el posterior desenvolupament d'assajos immunoquímics per a la detecció dels respectius microorganismes tal com es detallarà a continuació.

En una segona etapa, el projecte NanoBioSepRes va permetre establir una estreta col·laboració amb grups clínics de l'Hospital Germans Trias i Pujol a fi d'implementar les tècniques immunoquímiques a l'anàlisi de mostres clíniques. A més a més, l'altre gran repte d'aquest projecte era el desenvolupament d'un dispositiu de tipus PoC que permetés simplificar encara més la identificació dels patògens.

2.3 OBJECTIUS I ESTRATÈGIA CIENTÍFICA

L'objectiu general de la recerca abordada en aquesta tesi doctoral ha estat contribuir a la millora del diagnòstic de les malalties infeccioses. A la introducció s'ha parlat de la rellevància d'aquestes malalties i també de les limitacions dels actuals mètodes de diagnòstic. En aquest context, el nostre objectiu ha estat pensar i dissenyar noves estratègies que potencialment poguessin ajudar a superar aquestes limitacions. Entre els requeriments clínics que havíem d'assolir hi constaven: l'obtenció de resultats en un temps raonable (màxim 3 h), una bona especificitat pel que fa al tipus de bactèria causant de la malaltia, la possibilitat d'implementar fàcilment les noves tecnologies desenvolupades en l'àmbit clínic i que el cost de l'anàlisi fos sensat (màxim 10 €/anàlisi).

Considerant el potencial de les tècniques immunoquímiques, la varietat de configuracions possibles (des d'eines de cribratge fins a immunosensors implementables com a dispositius PoC, passant per tècniques que permeten la detecció multiplexada de diferents microorganismes) i el fet que moltes d'aquestes tècniques ja són d'ús habitual en molts laboratoris clínics, l'estratègia proposada va ser desenvolupar anticossos selectius d'alta afinitat contra antígens específics dels microorganismes més rellevants. Els anticossos, un cop avaluats, podrien ser

implementats en diferents configuracions immunoquímiques depenent de les necessitats o el lloc d'utilització.

En una primera instància, els microorganismes seleccionats, en base a la seva prevalença i possibilitats de causar malalties nosocomials⁵, van ser *Escherichia coli* (*E. Coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) i *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Pel que fa al primer microorganisme vam veure que al mercat existia una àmplia varietat d'anticossos contra diferents soques patogèniques i no patogèniques (vegeu Abcam, KPL, US biologicals, etc). En canvi, en el moment d'iniciar aquesta investigació hi havia molts menys immunoreactius disponibles pel que fa als altres dos microorganismes. Per altra banda, rarament les cases comercials proporcionaven informació de com s'havien produït els anticossos, la qual cosa dificulta la selecció i també la deducció del perfil de selectivitat que s'assoliria.

Així doncs, vam decidir centrar-nos principalment en *S. aureus* i *P. aeruginosa*, ambdós microorganismes de gran rellevància a nivell mundial en el camp de les malalties infeccioses i més concretament en el camp de les malalties nosocomials, una de les primeres causes de mortalitat en els països desenvolupats.

Amb aquest escenari, els objectius concrets abordats han estat:

1. La selecció del antígen diana més adient per a l'obtenció d'anticossos específics.
2. El disseny i la preparació dels corresponents haptens i immunògens, així com els reactius immunoquímics secundaris necessaris en cada cas.
3. L'obtenció d'anticossos, inicialment policlonals i la seva avaluació.
4. L'establiment de procediments immunoanalítics adients per a la detecció d'aquest antígen i la comprovació que veritablement eren indicadors de la presència del microorganisme en una determinada mostra.
5. La implementació dels procediments immunoquímics a l'anàlisi de mostres clíniques representatives.

2.4 ESTRUCTURA DE LA TESI DOCTORAL

L'objectiu final és el desenvolupament de noves estratègies per a la detecció de *S. aureus* i *P. aeruginosa*. El capítol 1 posa en context la rellevància de l'objectiu d'aquesta tesi a causa de la situació actual respecte a la detecció d'aquests microorganismes. En el mateix capítol s'inclou una publicació relacionada amb el marc teòric d'aquesta tesi, un treball de revisió publicat a la revista *Trends in*

Analytical Chemistry (publicació I) dels biosensors basats en nanopartícules per a la detecció de bacteris patogènics. En el capítol 2 s'explica l'estratègia dissenyada per abordar l'objectiu de la tesi, i els capítols 3 i 4 se centren en el desenvolupament dels respectius assajos immunoquímics per a *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Atesa la novetat inventiva i l'alt interès industrial de les estratègies seleccionades per a cadascun d'aquests microorganismes, gran part d'aquests treballs s'han patentat i posteriorment publicat en revistes científiques del camp. La publicació II recull la patent del treball relacionat amb el desenvolupament d'immunoreactius per a la detecció de *S. aureus* i la publicació III l'article publicat a la revista *Analytica Chimica Acta*. I de manera similar, la publicació IV recull la patent del treball relacionat amb tota la recerca realitzada per al desenvolupament d'immunoreactius i l'establiment d'un assaig immunoquímic per a la detecció de *P. aeruginosa* i la publicació V l'article enviat per ser publicat en la revista *Analytical Chemistry*, que es troba actualment en fase de revisió. Per a tots dos casos, tenint en compte la gran extensió del document corresponent a la patent i la poca informació addicional que aporta respecte a l'article corresponent, s'ha decidit adjuntar únicament les primeres pàgines de la patent (on es descriu la informació bàsica per si es vol consultar el document) i el text complet de l'article, on es recullen tots els resultats experimentals dels treballs així com la discussió i conclusions dels treballs.

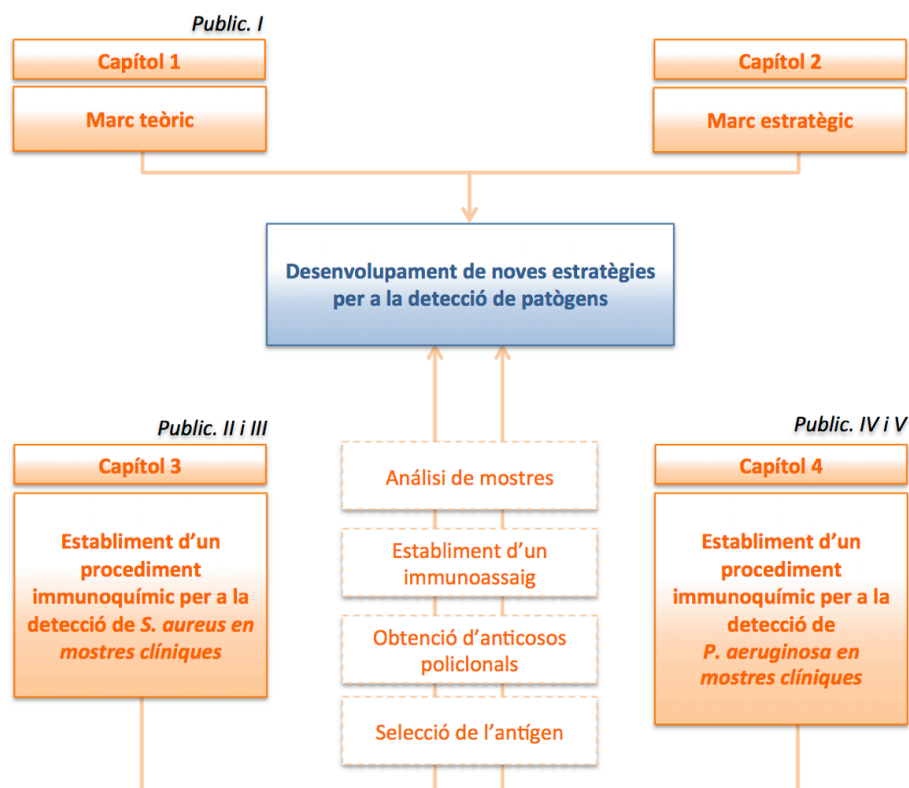


Figura 2.1 Esquema de l'estructura de la tesi, divisió dels capítols i publicacions derivades.

2.5 VISIÓ GENERAL DEL TREBALL EXPERIMENTAL REALITZAT

2.5.1 SELECCIÓ DE L'ANTIGEN

La selecció de l'antigen (Ag) és un dels punts clau per al desenvolupament d'un nou mètode d'identificació de patògens. Cal fer una recerca bibliogràfica exhaustiva per seleccionar l'Ag més adequat en cada cas. Per als dos microorganismes d'aquesta tesi doctoral, els antígens es varen seleccionar seguint els següents criteris: que fos específic de l'espècie, que es trobés en quantitats relativament elevades per assegurar una bona detectabilitat i alhora que fos una aproximació innovadora.

En el cas de *S. aureus* es va seleccionar una fracció peptídica del peptidoglicà (PG) present a la paret cel·lular. Aquest pèptid de 14 aminoàcids conté un pont pentaglicil específic de *S. aureus* i segons la bibliografia el peptidoglicà de *S. aureus* està altament entrellaçat per aquests pèptids, fet que ens portava a pensar que en una concentració relativament baixa de bacteri podríem detectar una alta concentració d'aquest pèptid específic i, en conseqüència, obtenir bons nivells de detectabilitat.

L'aproximació per a la detecció de *P. aeruginosa* va ser diferent. Aquest bacteri es caracteritza per la producció de diferents pigments i factors de virulència, entre ells la piocianina (PYO), que es va seleccionar com a diana per a la detecció del bacteri. Els tres motius principals que ens portaven a apostar per aquesta estratègia eren: l'especificitat, el fàcil accés per a la seva detecció ja que la toxina s'allibera al medi, i la possibilitat d'assolir una bona detectabilitat ja que una sola CFU podria segregat altes quantitats de toxina. A més a més, a la bibliografia, si bé s'han descrit diferents mètodes per a la detecció de PYO no hi havia cap anticòs contra aquest pigment i el mètodes descrits fins el moment no eren específics.

2.5.2 OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS ESPECÍFICS

En ambdós casos es varen produir anticossos policlonals i en tractar-se d'antígens de baix pes molecular era necessari el disseny d'un haptè d'immunització el qual es pogués conjugat a una biomacromolècula que induís la resposta immune en l'animal hoste. Es varen utilitzar conills blancs de la varietat New Zealand els quals es van sotmetre a un protocol d'immunització per tal d'aconseguir anticossos amb l'afinitat necessària.

2.5.3 ESTABLIMENT D'UN ASSAIG IMMUNOQUÍMIC

L'avaluació dels anticossos policlonals es va fer mitjançant ELISAs i posteriorment es varen establir assajos immunoquímics per a la detecció de l'Ag seleccionat per a cadascun dels microorganismes. Per tant, els assajos desenvolupats són els següents:

- Assaig de tipus ELISA en microplaca i assaig de tipus micromatriu (*microarray*) per a la detecció de *Staphylococcus aureus* mitjançant la detecció de l'estructura peptídica del peptidoglicà.
- Assaig de tipus ELISA per a la detecció dels pigments 1-hidroxifenazina i piocianina produïts per *Pseudomonas aeruginosa*.

Per cada un dels assajos se'n varen estudiar les condicions fisicoquímiques (pH, força iònica i tant per cent Tween® 20) del tampó de competència de l'assaig així com també els temps de competència i d'altres condicions, per tal de trobar les condicions més adients i que donessin lloc a assajos robustos i amb la detectabilitat necessària.

2.5.4 ANÀLISI DE MOSTRES

Un cop establerts els protocol immunoquímics es va procedir a confirmar que veritablement permetien la detecció dels microorganismes, i no tan sols dels antígens contra els quals s'havien produït els anticossos. Finalment, es varen fer els estudis necessaris per demostrar que era possible la seva utilització per a l'anàlisi de mostres clíniques.

En el cas de *S. aureus*, en primer lloc es va abordar la detecció d'un extracte de peptidoglicà comercial i posteriorment es va procedir a la detecció de cultius cel·lulars de *S. aureus* a diferents concentracions preparats pel grup de Microbiologia Aplicada de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) liderat pel Prof. Antoni Villaverde. A fi de millorar la detectabilitat, es varen estudiar diferents mètodes de trencament de la paret cel·lular amb la hipòtesi que si s'aconseguia alliberar o millorar l'accessibilitat del pèptid la detectabilitat de l'assaig també milloraria. Els cultius cel·lulars de *S. aureus* s'han mesurat tant en mostres de tampó com en mostres biològiques d'origen respiratori.

Pel que fa a la detecció de *P. aeruginosa*, primerament es varen quantificar els pigments (1-OHphz i PYO) dels sobrenedants de corbes de creixement de diverses

soques a diferents temps. Confirmada la hipòtesi que *P. aeruginosa* segrega ambdós pigments, es va procedir a la quantificació de mostres de pacients infectats. Gràcies a la col·laboració establerta en el marc del projecte NanoBioSepRes, amb els grups del Dr. Vicenç Ausina, cap del servei de microbiologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol (HGTiP) de Badalona, i el Dr. Juan Ruiz Manzano, cap del servei de pneumologia del mateix hospital, tots dos grups membres també de la Sociedad Espanyola de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) i del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), es van poder fer alguns estudis amb mostres de pacients amb sèpsies d'origen respiratori. Els tipus de mostra que es recollien foren rentats broncoalveolars (BAS, *broncoalveolar lavage*), broncoaspirats (BAS, *bronchial aspirate*), esput i plasma i es classificaven segons pacients colonitzats per *P. aeruginosa* o no colonitzats. *P. aeruginosa* està altament associat a problemes respiratoris i colonitza permanentment les vies respiratòries de pacients amb fibrosi quística. Conseqüentment, també es va intentar establir una col·laboració amb l'equip del Dr. Xavier de Gracia de l'Hospital Vall d'Hebron en què es varen seleccionar dos grups de pacients per fer un estudi inicial i quantificar els pigments en mostres d'esputs de pacients amb problemes respiratoris crònics. Un grup de pacients colonitzats per *P. aeruginosa* (confirmat per cultiu d'esput) i un segon grup de pacients amb problemes respiratoris però no colonitzats per *P. aeruginosa* (control negatiu).

3 Establiment d'un procediment immunoquímic per a la detecció de *Staphylococcus aureus* en mostres clíniques

En aquest capítol es descriu el disseny i desenvolupament d'immunoreactius per a la detecció de *S. aureus* així com també els estudis posteriors per tal d'establir un assaig immunoquímic de tipus ELISA en format microplaca i un segon format de micromatriu (*microarray*). Després de quantificar les primeres mostres provinents de cultius cel·lulars de *S. aureus* es va decidir avaluar diferents tractaments de trencament de la paret bacteriana amb la finalitat de millorar la detectabilitat del mètode. Aquest tractament va mostrar tenir efecte sobre la resposta de l'ELISA, per la qual cosa es van haver d'estudiar noves condicions que permetessin la mesura de mostres tractades. Aquest treball ha donat lloc a dues publicacions, una patent (publicació II) que s'adjunta l'apartat 3.4.1 i una publicació a la revista *Analytica Chimica Acta*, que s'adjunta a l'apartat 3.4.2 d'aquest capítol.

3.1 INTRODUCCIÓ

El 1880 Alexander Ogston va descriure les primeres infeccions provocades per cocs^f així com el seu rol en septicèmies^g i en la formació d'abscessos^h. Per la seva proliferació agrupada semblant a la dels penjolls de raïm, els va anomenar estafilococs (*staphilococcus*), del grec *staphyle*, raïm, i *kokkus*, baiaⁱ. Quatre anys més tard, el 1884, Rosenbach va estudiar algunes espècies del gènere, entre elles *Staphylococcus aureus*, la més virulenta de totes, d'un color daurat característic a causa de la producció del pigment carotenoide.

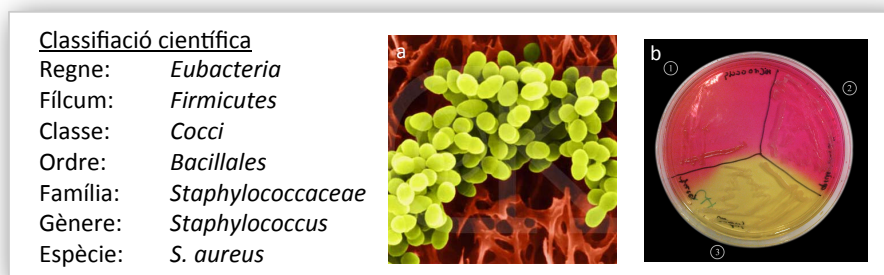


Figura 3.1 Classificació científica de l'espècie *S. aureus* i imatges de l'espècie. **a)** Imatge SEM d'una colònia de *S. aureus*. **b)** Placa de Manitol-sal-agar amb colònies de *Micrococcus* sp. (1), *Staphylococcus epidermidis* (2) i *S. aureus*. (3). Reproduït amb permís de l'article⁷¹.

^f COC: Cèl·lula esfèrica.

^g SEPTICÈMIA: Infecció generalitzada greu, que és deguda a l'existència d'un focus infecció dins el cos, del qual, constantment o periòdicament, passen gèrmens patògens a la sang circulant.

^h ABSCÉS: Acumulació de pus en un teixit orgànic.

ⁱ BAIA: Fruit simple de mesocarpi i endocarpi carnosos, com ara els grans de raïm o els tomàquets.

S. aureus és un bacteri coc grampositiu d'1 µm de diàmetre aproximadament⁷². Els estafilococs són anaerobis facultatius^j que creixen per respiració aeròbica o per fermentació que produeix àcid làctic com a producte de rebuig. Són bacteris catalasa^k-positiu i negatiu-oxidasa^l. *S. aureus* pot créixer en un ampli rang de condicions de temperatura (15-45°C) i a concentracions salines altes (fins a un 15% de NaCl). Totes aquestes característiques són importants per entendre les capacitats colonitzadores d'aquest bacteri i a la vegada ens permeten distingir-lo d'altres espècies. N'és un bon exemple el medi selectiu Chapman o agar-sal-mannitol, que per l'alt contingut salí inhibeix el creixement de la resta d'espècies gramnegatives. El medi conté un indicador (vermell de fenol) que, en presència de *S. aureus*, vira a color groc per la producció de compostos àcids derivats de la fermentació del mannitol.

3.1.1 RELLEVÀNCIA DE *S. aureus*

Cent anys després de les primeres identifications, *S. aureus* segueix sent un patògen versàtil i perillós per a l'espècie humana, especialment les espècies resistents a antibiòtics. Les infeccions per *S. aureus* estan freqüentment associades a malalties nosocomials, infeccions de la pell i teixits tous, sèpsies, endocarditis i pneumònies. Si bé històricament les infeccions per *S. aureus* han estat associades als hospitals, avui en dia són també una causa d'infecció generalitzada entre la comunitat. Es calcula que entre un 20 i un 40% de la població sana està permanentment o transitòriament colonitzada per *S. aureus*⁷³. El fet que aquest bacteri colonitzi la pell, les fosses nasals o el tracte intestinal no implica patir cap malaltia si el bacteri no passa a teixits més profunds, on aleshores sí que causa infecció. La majoria de les infeccions estan provocades per bacteries colonitzants, adquirides a través del contacte amb altres persones o d'una exposició mediambiental. *S. aureus* també suposa un risc per a la indústria alimentària: la manipulació del menjar per part de persones colonitzades més unes condicions d'higiene insuficients pot fer que el patògen passi a la cadena alimentària.

^j ANAEROBI FACULTATIU: Normalment obté ATP per respiració aeròbica, però si hi ha presència d'oxigen també és capaç de canviar a la fermentació.

^k CATALASA: Hidroxoperoxidasa, enzim que catalitza la reacció de dismutació del peròxid d'hidrogen a oxigen i aigua.

^l OXIDASA: Enzim que té la propietat de fixar l'oxigen.

3.1.2 RESISTÈNCIA ANTIMICROBIANA

S. aureus ha demostrat una gran capacitat d'evolució i eficàcia d'adaptació al medi creant resistència a diferents classes d'antimicrobians. El 1928, Alexander Fleming va descobrir el primer antibiòtic de la història, la penicil·lina. A principis de la dècada dels quaranta es començava a emprar en hospitals, el 1942 es van començar a identificar els primers estafilococs resistents a la penicil·lina, i el 1960 un 80% dels estafilococs aïllats eren resistents a la penicil·lina. Més tard, el 1961, es va introduir la meticil·lina, un altre antibiòtic de tipus β -lactàmic per combatre les resistències a les penicil·lines i en pocs anys també aparegueren les primeres soques de MRSA⁷⁴.

Actualment la designació MRSA s'utilitza per designar soques resistents a **antibiòtics β -lactàmics** (penicil·lines, meticil·lina, oxacil·lina, cefalosporines i carbapenems), ja que moltes de les soques residents a meticil·lina presenten resistència a més d'un antibiòtic β -lactàmic. A dia d'avui, el MRSA representa el major patògen bacterià a nivell mundial, moltes de les soques aïllades són resistents a més d'una droga (*multi-drug resistant*), tant a antibiòtics β -lactàmic com a altres classes de drogues, com ara macròlids, aminoglicòsids o fluoroquinolones. La **resistència a les meticil·lines** pot ser deguda a tres mecanismes: a) hiperproducció de β -lactamases, b) modificació de les penicil·lines d'enllaç a les proteïnes normals (PBPs, *penicillin-binding proteins*) o c) producció addicional d'un enllaç a la penicil·lina PBP2a, amb afinitat reduïda per la penicil·lina i les β -lactàmes en general, essent aquesta tercera la més freqüent de totes. La PBP2a és el producte del gen *mecA* i els gens reguladors *mecl* i *mecR1*⁷⁵.

Amb la necessitat d'idear nous antibiòtics per tractar MRSA, els **antibiòtics glicopeptídics** (en especial la vancomicina) varen prendre protagonisme per tractar aquest tipus d'infeccions. No obstant això, pocs anys després també s'han identificat soques resistents-intermèdies (VISA, *vancomycin intermediate S. aureus*) i soques completament resistents (VRSA, *vancomycin resistant S. aureus*). La **resistència a la vancomicina i a la teicoplanina** està associada a l'accessibilitat al dipèptid DAla-DAla de la paret del peptidoglicà (vegeu apartat 3.1.3 per l'estructura química del peptidoglicà). Per ara, s'han descrit sis soques VRSA i totes elles expressen el gen *vanA* que confereix un alt nivell de resistència als dos antibiòtics glicopeptídics. L'operó^m *vanA* conté un conjunt de gens (*vanA* i *vanH*) que codifiquen una modificació en la síntesi del precursor del peptidoglicà introduint un grup terminal DAla-DLac en comptes del DAla-DAla esperat^{76,77}.

^m OPERÓ: Regió cromosòmica que conté un cert nombre de gens estructurals i un operador que els controla.

Resumint, les resistències a les primeres classes d'antibiòtics que es varen introduir han estat generalment conseqüència d'una transferència genètica horitzontal (HGT, *Horizontal Gene Transfer*)ⁿ com per exemple dos dels casos més alarmants de resistència a *S. aureus*: la meticil·lina i la vancomicina associats a canvis estructurals de la paret bacteriana. Mentre que les resistències a antibiòtics posteriors han estat fruit de mutacions espontànies més una selecció positiva, com ara la resistència a les fluoroquinolones, associada a la inhibició de la replicació del DNA, en particular pel bacteris grampositius a causa de la inhibició de la diana Topoisomerasa IV^{78,79}. La detecció del mecanisme de resistència i la base genètica és important tant pel suport dels antibiòtics com pel control de susceptibilitat de *S. aureus*.

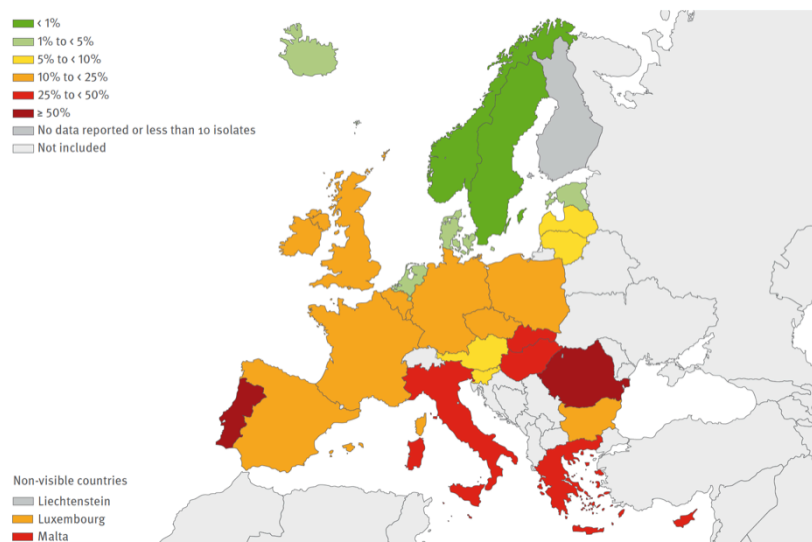


Figura 3.2 Percentatge de soques MRSA invasores aïllades en sang i fluid cerebrospinal a la Unió Europea el 2011. Reproduït amb permís de EARS-Net³.

Les tendències sobre les resistències antimicrobianes varien entre països. La ECDC estima que des del 2011 el percentatge de MRSA aïllats s'està estabilitzant i fins i tot decreix en alguns països (Bèlgica, França, Alemanya, Irlanda, Espanya i el Regne Unit). Malgrat tot, MRSA segueix sent una de les prioritats sanitàries públiques, ja que el percentatge de MRSA segueix sent elevat en diversos països, especialment al sud d'Europa, on el percentatge de MRSA d'entre els *S. aureus* aïllats encara està per sobre del 25%³.

ⁿ HGT: També coneguda com a transferència genètica lateral (LGT, *Lateral Gene Transfer*), és un procés en què l'organisme transfereix el material genètic a una altra cèl·lula que no és descendent.

3.1.3 ESTRUCTURA DE LA PARET BACTERIANA

La membrana citoplasmàtica envolta el citoplasma de les cèl·lules vives i separa els components intracel·lulars de l'entorn extracel·lular. La seva composició fonamental és l'estructura de bicapa lipídica més un complex de proteïnes, lípids i hidrats de carboni.

Després de la membrana citoplasmàtica, les bactèries estan envoltades per una complexa membrana cel·lular encarregada de satisfer diverses funcions: donar suport estructural, protegir el contingut de la cèl·lula i mantenir la pressió osmòtica, i prevenir la sobreexpansió quan l'aigua entra dins de la cèl·lula.

La composició de la paret bacteriana varia entre espècies però quasi totes les bactèries tenen un component comú, el sàcul de mureïna. Aquesta estructura macromolecular anomenada mureïna o sàcul de mureïna, del llatí *murus*, paret, i *sacculus*, sac⁸⁰, també se la coneix com a peptidoglicà (PG) per la seva composició química, formada per cadenes de glicans entrelaçades entre elles a través de fragments peptídics. Segons les diferències estructurals fonamentals de les parets bacterianes podem classificar els bacteris en dos grans grups, els grampositius i els gramnegatius. El PG és el component majoritari de la paret dels grampositius, tant en termes de dimensió com en pes molecular, mentre que, en els gramnegatius, el component majoritari és el lipopolisacàrid (LPS, *Lipopolysaccharide*) i la capa de PG és més fina.

L'estructura del PG dels bacteris grampositius i gramnegatius està en ambdós casos formada per una estructura de disacàrids, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) i àcid β -(1-4)-*N*-acetilmuràmic (MurNAc) de la qual pengen ramificacions peptídiques, que formen una unitat estructural que es va repetint per formar aquesta macroestructura en forma de malla anomenada PG. Les estructures peptídiques varien entre espècies, en el cas particular de *S. aureus* conté un pèptid principal (*stem peptide*) format per LAla-D γ Glu-LLys-DAla-DAla i un pèptid pont (*cross-link peptide*) de cinc glicines que uneix la LLys de la tercera posició d'un pèptid principal amb la DAla de la quarta posició d'un altre pèptid principal⁸¹ (vegeu Figura 3.3A i B). El pentapèptid pont de glicines és específic de *S. aureus*, introdueix flexibilitat en l'estructura i per aquest motiu permet una altíssima densitat de reticulació del peptidoglicà. A més, aporta una major estabilitat a la paret bacteriana⁸².

L'estructura bàsica del PG freqüentment pot presentar modificacions, l'objectiu de les quals pot ser augmentar la resistència antimicrobiana. De fet, el nivell de resistència en MRSA depèn entre d'altres factors del factor *fem* (factor essencial per a la resistència a meticil·lina). El factor *fem* inclou *femX*, *femA* i *femB*, els quals

codifiquen les proteïnes FemX, FemA i FemB respectivament. Aquestes proteïnes estan involucrades en la biosíntesi del PG i activen l'addició seqüencial de les glicines a partir de la lisina de l'*stem peptide* del lípid II, el precursor del PG^{82,83}. La FemX catalitza d'addició de la primera unitat de glicina, la FemA la segona i tercera unitat, i la FemB la quarta i cinquena unitat per completar l'estructura del pèptid pont del lípid II. L'eliminació del *femX* és letal per a *S. aureus*, mentre que l'eliminació del factor *femA* i *femB* en resulta un segment pont amb un i tres glicines respectivament. Com a conseqüència d'aquestes mutacions, l'estructura resultant difereix lleugerament del *S. aureus* silvestre (*wildtype*) i alhora les fa menys sensibles a la digestió amb lisostafina, una endopeptidasa que trenca selectivament l'enllaç Gly-Gly. No obstant això, la presència d'aquests mutants és realment baixa, ja que l'eliminació dels factors *fem* va associat a altres mutacions relacionades amb l'eficiència metabòlica i l'aptitud per a la supervivència^{84,85}. Pel que fa a la part glicosídica, *S. aureus* també presenta variacions. Incorpora una *o*-acetilació del GlcNAc (vegeu Figura 3.3 C) a l'estructura i crea així resistència envers la lisozima, una muramidasa que catalitza la hidròlisi selectiva de la unió β -1,4 entre MurNAc i GlcNAc del peptidoglicà⁸⁶. Aquesta mutació és bastant freqüent, es troba entre un 35 i un 90% dels *S. aureus* aïllats⁸⁶.

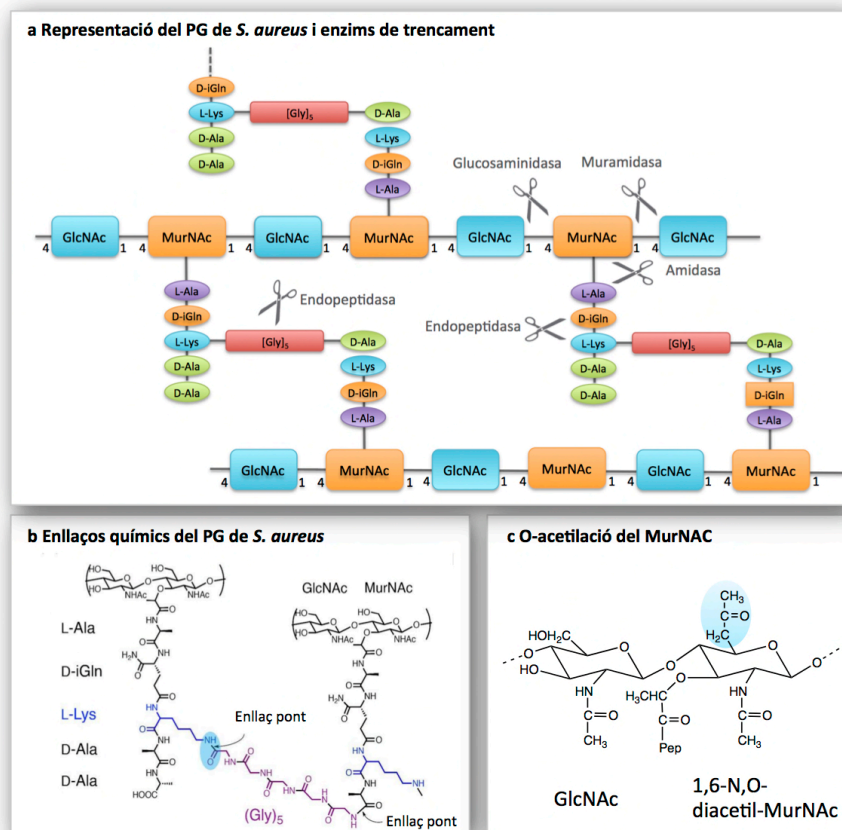


Figura 3.3 Esquema de l'estructura química del peptidoglicà de *S. aureus*. **a)** Esquema de la distribució i hidrolases que trenquen enllaços del PG. **b)** Representació tridimensional dels enllaços peptídics **c)** *o*-acetilació del MurNAc. Reproduït amb permís dels articles^{82,87}.

Altres estudis han demostrat que l'estructura del peptidoglicà es pot veure alterada en resposta a canvis en les condicions de creixement com ara la concentració salina^{82,88}, aminoàcids⁸⁹ o antibiòtics⁹⁰ presents en el medi. Per altra banda, la paret cel·lulars dels grampositius, i *S. aureus* en particular, es troba densament funcionalitzada per àcids teïcoics (TA, *teichoic acid*), uns glicopolímers aniònics complexos. Aquests poden estar covalentment units al PG i aleshores es parla d'àcids teïcoics de paret (WTA, *wall teichoic acids*) o a la membrana citoplasmàtica, coneguts com a àcids lipoteïcoics (LTA, *lipoteichoic acid*)⁹¹. Els àcids teïcoics TAs de *S. aureus* estan formats per subunitats repetitives de poliòl fosfatè, com ara el fosfat de ribitol o de glicerol. Les estructures WTA varien extensament entre espècies i a vegades fins i tot entre grups de clons. Els WTA estan covalentment units al 6-OH del MurNAc i, per tant, juguen un paper important en la resistència contra els β -lactàmics. Les MRSA presenten un major nombre d'TAs⁹².

A diferència d'altres espècies d'estafilococs, la majoria de les soques de *S. aureus* estan recobertes de proteïna A. Aquesta proteïna s'utilitza àmpliament en bioquímica gràcies a la seva afinitat per les immunoglobulines (Ig), especialment les de tipus G (IgG)⁹³. La coagulasa és una altra proteïna associada a la paret cel·lular. La podem trobar lligada a la cèl·lula (coagulasa lligada; ClfA, *clumping factor*) o de forma lliure en el medi (coagulasa lliure). El ClfA és capaç de coagular el plasma i convertir el fibrinogen en fibrina⁹⁴. Per contra, la forma lliure necessita unir-se a la protrombina per activar-se i adquirir la capacitat coagulant. *S. aureus* (coagulasa positiu) és l'única espècie del gènere *Staphylococcus* que sintetitza aquest enzim.

Per últim, algunes soques de *S. aureus* estan recobertes per una capa de polisacàrid extern anomenada **càpsula mucoide**. Aquesta confereix capacitats de major adherència així com un augment de l'efecte antifagocític. S'ha identificat fins a 11 serotips en base a l'estructura de la càpsula, essent els serotips 5 i 8 els que predominen entre les soques clíniques de *S. aureus*⁹⁵. Són estructures repetitives compostes per àcid 2-acetamido-2-deoxi-D-manurònic (D-ManNAcA) i dos residus de 2-acetamido-2,6-dideoxi galactosa amb configuració D- i L- (D- i L-FucNAc). El tipus 5 està *o*-acetilat a la posició 3 del D-FucNAc i en canvi el tipus 8 s'acetila a la posició 4 del D-ManNAcA (vegeu Figura 3.4).

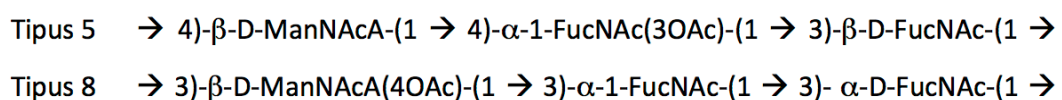


Figura 3.4 Estructures de les càpsules de *S. aureus* de tipus 5 i tipus 8.

3.1.4 ANTICOSSOS CONTRA *S. aureus*

Una gran part dels anticossos oferts per fonts comercials així com en treballs publicats a la literatura científica estan basats en la utilització del conjunt bacterià, sencer o en forma de lisat, com a immunogen^{96,97}. L'ús d'antígens aïllats i específics és menys freqüent, i encara ho és menys l'ús d'antígens estructurals específics, com el seleccionat en aquesta tesi doctoral com a diana (vegeu apartat 3.3.1).

Per una banda, s'ha descrit la producció d'anticossos específics contra proteïnes de superfície i contra proteïnes excretades. La proteïna A és el biomarcador més emprat per a la detecció de *S. aureus*⁴¹, tanmateix el 17% de les soques MRSA no expressen proteïna A ni el factor d'aglutinació (ClfA, *clumping factor*) en prou abundància i per tant no són detectables amb aquesta estratègia⁹⁸. El ClfA és una proteïna associada a la superfície cel·lular de *S. aureus* que promou la unió del fibrinogen o fibrina a la cèl·lula bacteriana⁹⁴.

Altres treballs han basat la producció d'anticossos en la detecció de proteïnes excretades, com per exemple l'hemolisina⁹⁹, la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL, *panton-valentine-leukocidin*)¹⁰⁰ o els superantigens (SAGs, *superantigens*), els quals se subclassifiquen en enterotoxines estafilocòcciques (SE, *staphylococcal enterotoxin*)¹⁰¹⁻¹⁰³ i la toxina de síndrome de xoc tòxic (TSST, *toxic shock syndrome toxin*)^{101,104}.

Per altra banda, trobem una gran varietat d'anticossos contra parts estructurals de la paret del microorganisme, com ara el polisacàrid capsular¹⁰⁵, el TA o el PG¹⁰⁶. Molts d'aquests anticossos, igual que els anticossos esmentats anteriorment en aquest apartat, s'han descrit a partir d'estudis serològics de pacients, i en menor mesura trobem també anticossos produïts a partir de la immunització amb algun fragment de paret bacteriana. En aquesta línia, la majoria de treballs es basen en la immunització amb extractes de paret bacteriana purificats, com ara Merket *et al.*¹⁰⁷, que han immunitzat amb PG de *Neisseria gonorrhoeae* i han obtingut un mAb IgM (B10.G6) amb un LOD en ELISA de 10 ng mL⁻¹ que detecta tant els PGs de bacteris grampositius com gramnegatius; Wiriyachaiporn *et al.*¹⁰⁸ també descriuen l'obtenció d'un mAb amb el qual s'ha desenvolupat un test de tira reactiva capaç de detectar 10⁶ CFU mL⁻¹ de *S. aureus* en mostres d'origen respiratori (esput i BAL) o Ohsawa *et al.*¹⁰⁹, que van immunitzar ratolins amb extractes de paret desacetilada, seleccionant 22 hibridomes productors d'anticossos que posteriorment van avaluar amb finalitats terapèutiques. Més recentment, s'ha descrit un mAb (SA7D6) contra la fracció proteica de la paret¹¹⁰. Amb aquests anticossos aconseguen desenvolupar un ELISA capaç d'aconseguir una detectabilitat de l'ordre de 10² – 10³ CFUs en llet. No s'ha descrit la seva implantació a l'àmbit clínic.

En base a l'especificitat del pont de (Gly)₅ que presenta el PG de *S. aureus*, altres autors han adreçat la producció d'anticossos contra l'oligopèptid de cinc glicines. El primer treball que es va descriure va ser al 1997¹¹¹, immunitzant amb albúmina de sèrum humà-(CH₂CO-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly)₃ per produir anticossos policlonals, els quals es van emprar per desenvolupar un assaig d'aglutinació de làtex (LOD: 10 ng) però que requereix volums de mostra de 1 mL i necessita un temps de 2 h. Poc temps més tard, Wergeland *et al.*¹⁰⁶ varen immunitzar ratolins BALB amb el pentapèptid (Gly)₅ lliure i obtingueren mAb de tipus IgM, que reconeixen el PG de *Staphylococcus* en solució amb un LOD de 0,2 ng mL⁻¹ però amb un temps total d'assaig de 24 h. Més recentment, i possiblement en paral·lel a la realització d'aquesta tesi doctoral, Sandhu *et al.*¹¹² van dissenyar un immunogen basat en el nucleòtid de Park, un precursor de l'estructura del peptidoglicà⁸². El nucleòtid UDPMurNAc-LAla-*iso*DGlu-LLys-(Gly)₅-DAla-DAla, covalentment unit a través del nucleòtid UDP (vegeu Figura 3.5) es va unir a una proteïna (albúmina de sèrum boví; BSA, *bovine sèrum albumin*) i es van produir anticossos en un hoste híbrid de mula-ovella. L'assaig és capaç de detectar 0,1 µg d'extractes de paret, però el format l'assaig requereix la immobilització de la paret bacteriana sobre la placa. En els dos últims treballs citats, els anticossos obtinguts s'avaluen per ELISA, ja sigui en format d'inhibició o desplaçament i se'n demostra l'especificitat dels anticossos obtinguts en front d'altres microorganismes. Aquests treballs posen de manifest la necessitat de desenvolupar noves eines per a la detecció de *S. aureus* apostant per l'immunoassaig com a tècnica avantatjosa. Tanmateix, cap d'ells no implementa l'assaig en mostres clíniques i per tant no s'avaluen com a potencials eines de diagnòstic, possiblement a causa dels inconvenients que presenten: temps d'assaig massa llargs, volums de mostra elevats o pretractaments de mostra complexos, cosa que encara complicaria més el procés si es pretén implementar en mostres biològiques. Així el format d'assaig desenvolupat per Sandhu *et al.* requerirà fer algun tipus d'aïllament per tal d'immobilitzar els fragments de paret a la microplaca, cosa que no sembla viable des d'un punt de vista pràctic, si el que perseguim és incrementar l'eficiència del diagnòstic.

Alguns dels estudis serològics també s'han centrat en l'estudi dels anticossos contra el pont de cinc glicines. La presència d'anticossos circulants contra el pont de (Gly)₅ fa pensar que durant el creixement dels bacteris s'alliberarien fragments de PG¹¹³⁻¹¹⁶. En general, la resposta immune és la producció d'Igs de tipus G, però en infeccions de caràcter greu també s'han detectat Igs del tipus M, en menor concentració^{113,116}.

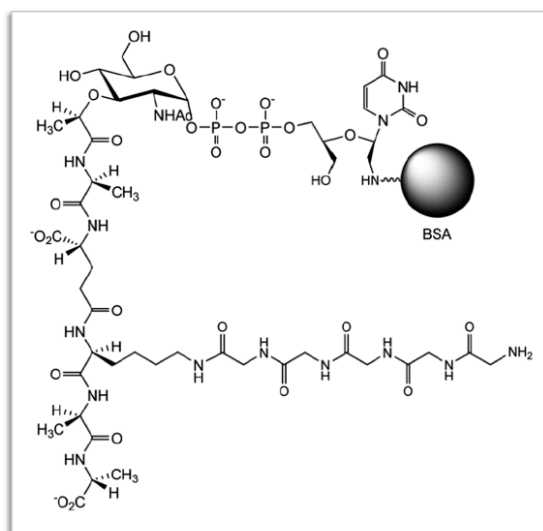


Figura 3.5 Immunogen emprat per Sandhu i col·laboradors¹¹² per al desenvolupament d'anticossos contra la paret bacteriana de *S. aureus*.

En la següent taula es recullen els diferents treballs publicats relacionats amb la producció d'anticossos contra la paret bacteriana de *S. aureus*.

Taula 3.1 Anticossos contra *S. aureus* i la seva utilitat

Ag	Hoste	Ab	Finalitat	REF
(Gly) ₅	Ratolí BALB	mAb IgM _k *	Test de diagnòstic	106
Albúmina de sèrum humà-(CH ₂ CO-Gly-Gly-Gly-Gly) ₃	Ratolí	pAb	Test de diagnòstic	117
Nucleòtid de Park conjugat a BSA	Mula-Ovella	pAb**	Test de diagnòstic	112
PG de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Ratolí BALB	mAb IgM	Test de diagnòstic	107
PG de <i>S. aureus</i>	Ratolí	mAb	Test de diagnòstic	108
Paret bacteriana de <i>S. aureus</i> desacetilada	Ratolí BALB	mAb IgG	Vacuna contra <i>S. aureus</i>	109
Càpsula de tipus 5 i 8 de <i>S. aureus</i> conjugat a exoproteïna A o a IgG	Humà	IgG	Vacuna contra <i>S. aureus</i>	105
<i>S. aureus</i> inactivat per calor	Humà (amigdalitis)	IgG, IgA menor proporció	Vacuna contra <i>S. aureus</i>	97
<i>S. aureus</i>	Humà i ratolí (osteomielitis [†])	IgG	Estudis serològics	118
<i>S. aureus</i>	Humà	IgA	Estudis serològics	119
<i>S. aureus</i>	Humà (infecció superficial o infecció greu)	IgG, IgM	Estudis serològics	113
<i>S. aureus</i>	Humà (endocarditis o bacterièmia)	IgG, IgM	Estudis serològics	114
<i>S. aureus</i>	Humà (bacterièmia)	IgG	Estudis serològics	115
<i>S. aureus</i>	Humà (pacients amb diferents problemàtiques)	IgG, IgM	Estudis serològics	116

[†]Osteomielitis: Inflamació simultània de la medul·la òssia i l'os.

L'obtenció d'aquests anticossos té principalment dues finalitats. Per una banda, el desenvolupament de noves eines de diagnòstic i consegüentment implementar

aquests anticossos en immunoassajos^{107,108}. I per l'altra, com a eines terapèutiques, ja sigui mitjançant la generació de vacunes^{120,121} o bé obtenint anticossos terapèutics¹⁰⁹.

3.1.5 APROXIMACIONS IMMUNOQUÍMIQUES PER AL DIAGNÒSTIC D'INFECCIONS CAUSADES PER *S. aureus*

La determinació immunoquímica de *S. aureus* als laboratoris clínics ha estat fonamentalment adreçada a l'**anàlisi serològic**, és a dir, la determinació d'anticossos circulants en sang. Aquests assaigs es basen a confrontar les mostres dels pacients amb antígens específics dels bacteris que es volen determinar. Així doncs, trobem immunoassajos *in vitro* per determinar el títol d'anti-glucosaminidasa en sang¹²², de TSST¹⁰⁴ o de PVL¹²³ entre d'altres. Tanmateix, donada la falta d'especificitat de molts d'aquest antígens, alguns autors apunten cap a la necessitat de desenvolupar sistemes multiplexats. En aquesta direcció, recentment s'ha descrit el desenvolupament d'un test per detectar anticossos contra *S. aureus* en mostres de sèrum¹²⁴). L'assaig utilitza 14 antígens diferents i és avaluat en mostres de pacients que pateixen osteomielitis, a la vegada que intenta investigar el perfil de producció d'anticossos contra els diferents antígens al llarg de la malaltia. L'estudi del perfil de producció d'anticossos podria ajudar a proporcionar tractaments més personalitzats als pacients¹²⁵. Tot i això, aquestes aproximacions permeten obtenir un perfil indicatiu d'infecció però necessiten complementar-se amb altres tècniques confirmatòries, arran de la falta d'especificitat del mètode. A més a més, cal tenir en compte que la memòria immunoquímica fa que els pacients sans també tinguin unes concentracions basals de IgG contra *S. aureus*¹²⁶ i aquestes varien segons el temps d'exposició al bacteri.

També s'ha descrit el desenvolupament d'assaigs immunoquímics per a la determinació de la presència del bacteri en mostres biològiques. Els assaigs disponibles utilitzen habitualment els anticossos descrits en l'apartat anterior (3.1.4). Al mercat trobem molts **tests d'aglutinació de làtex** comercials, amb sensibilitats entre el 80 i el 100% per les soques MRSA i MSSA¹²⁷. Com a exemples, tenim el Dry Spot Staphytest PlusTM test (Oxoid), el test PastorexTM Staph Plus (Bio-Rad), el Slidex[®] Staph-Kit o el test Slidex[®] Staph Plus (bioMérieux). L'avantatge principal d'aquests tests és el ràpid temps de detecció, ja que s'obté una resposta en tan sols 20 segons, però, per contra, la majoria d'aquests assaigs no especifiquen ni el LOD de la tècnica, ni el tipus d'anticòs que utilitzen i, per tant, desconeixem també l'especificitat del mètode. A més, aquesta tècnica no permet la quantificació.

Una altre tipus d'assaig són els **tests de tira reactiva**, que detecten la proteïna A¹²⁸, el PBP2⁴¹ o la PVL¹²⁹ amb una sensibilitat d'entorn el 70% ja que aquesta proteïna no és present en totes les soques⁴¹ o tests amb anticossos contra l'enterotoxina SEB amb límits de detecció en llet de 10 ng mL⁻¹ i 100 ng mL⁻¹ per mostres d'esput. Molts d'aquests tests també s'han comercialitzats gràcies als avantatges pel que fa al cost de la tècnica, rapidesa de l'assaig, fàcil manipulació i possibilitat de dispositius portables; tanmateix, molts dels tests no són quantificables, no reporten la sensibilitat de la tècnica i tampoc es dona massa informació de com s'han obtingut els anticossos emprats.

Un altre treball descriu un **FIA** per a la detecció directa de *P. aeruginosa*, utilitzant una anti-IgG marcada amb el fluoròfor Cy5¹³⁰. El LOD assolit és de 5,20·10⁴ CFU mL⁻¹, però l'assaig utilitza uns anticossos comercials dels quals, de nou, es desconeix l'especificitat, i el treball no publica estudis de reactivat creuada. Jenko i col·laboradors han descrit una **micromatriu** capaç de detectar 10 toxines simultàniament¹⁰³. D'entre totes les toxines, detecta la SEB específica de *S. aureus* amb els LOD de l'orde del pg mL⁻¹, els més baixos reportats fins avui, 1,3 per tampó, 51 per fluids nasals, 8,2 per excrements o 3,3 en urina. L'anticòs anti-SEB (SLB1202) ha estat produït en ovella i ha estat obtingut comercialment de Toxin Technology, Inc. (Sarasota, Florida, EEUU). Com a alternativa també s'ha descrit un assaig basat en una micromatriu multiplexada que detecta 7 SE amb uns límits de detecció d'entre 0,1 a 0,5 ng mL⁻¹ en mostres alimentàries i biològiques¹³¹. El temps d'incubació varia de 17 a 2 h, segons si es treballa amb portaobjectes de vidre o portaobjectes recoberts d'or, respectivament. Aquesta segona opció, permet reduir el temps de l'assaig però incrementa el cost d'anàlisi.

Pel que fa als **biosensors**, trobem diversos sensors, majoritàriament basats en la detecció de proteïna A, com ara aquests dos biosensor amperomètric^{132,133} amb LOD de 2,3·10³ CFU mL⁻¹ o 1 CFU mL⁻¹. Ambdós amb detectabilitats acceptables per a la seva implementació en el camp del diagnòstic, però les dues plataformes no són adequades per a l'anàlisi d'un nombre de mostres elevades, fet que incrementa el cost de l'anàlisi/mostra.

Si bé alguns d'aquets mètodes descrits aporten avantatges considerable quant a rapidesa del mètode, multiplexació de l'assaig o baixes detectabilitats, pràcticament cap dels mètodes actuals engloba tots els requeriments per a l'obtenció d'una tècnica de diagnòstic òptima. Altrament, cal remarcar la importància de l'anticòs en el desenvolupament d'una tècnica immunoquímica. L'anticòs és l'element de reconeixement i, per tant, és un factor clau quant a termes de detectabilitat de l'assaig però també en termes de sensibilitat. Un disseny racional de l'immunogen permet fer una predicció altament acurada de les possibles reactivitats creuades a

esperar, mentre que si s'immunitza amb un extracte l'estructura del qual no es pot caracteritzar a nivell atòmic, és possible que pugin aparèixer reactivitats creuades no desitjades. A més a més de l'especificitat de l'anticòs, que vindrà donada per la diana que se seleccioni, cal acompanyar-ho d'un bon disseny d'immunogen. L'obtenció d'un bon anticòs obre les portes a desenvolupar una àmplia varietat de tècniques immunoquímiques d'anàlisi, incloent diversos tipus de biosensors.

3.2 OBJECTIU I ESTRATÈGIA

A causa de la manca actual de sistemes de detecció de *S. aureus* mitjançant sistemes específics, ràpids i de fàcil manipulació, l'objectiu que es proposava en aquest capítol 3 era el desenvolupament d'un assaig de tipus ELISA per a la detecció específica de *S. aureus*. Per tal d'abordar aquest objectiu, en primer lloc s'havia de seleccionar la diana, a continuació desenvolupar els anticossos específics contra la diana escollida i, per últim, desenvolupar l'immunoassaig. A continuació es detallen les directrius del procés que s'ha seguit, però la informació més detallada del treball realitzat s'inclou a l'article (publicació III, apartat 3.4.2) que s'adjunta al final d'aquest capítol.

3.2.1 SELECCIÓ DE LA DIANA I PREPARACIÓ DELS IMMUNOREACTIUS

La fracció peptídica del peptidoglicà (PG) present a la paret de *S. aureus* es va seleccionar com a diana específica per a la detecció d'aquest bacteri. Tal com s'ha descrit en l'apartat 3.1.3, el PG de *S. aureus* està format per dos *stem peptides* i un pèptid pont de cinc glicines característic de *S. aureus*. Aquesta seqüència d'aminoàcids forma una unitat base que es repeteix i s'entrellaça entre si per formar l'estructura del PG. Tenint en compte tota aquesta informació, vam pensar que aquesta seqüència d'aminoàcids era una bona diana per a la producció d'anticossos, tant per la seva especificitat com per la possibilitat de detectar grans concentracions de pèptid en baixes concentracions de bacteri.

Un cop seleccionada la diana es van dissenyar els haptens corresponents. Tal com es descriu en la Figura 1 de la publicació III (vegeu apartat 3.4.2), es van dissenyar i sintetitzar dues dianes (PSau5 i PSau7), dos haptens d'immunització (PSau6 i PSau8) i dos haptens de competició (PSau3 i PSau4), pensats per a la producció d'anticossos específics i els posterior desenvolupament d'immunoassajos.

3.2.2 PRODUCCIÓ I AVALUACIÓ DELS ANTICOSSOS ESPECÍFICS

Cadascun dels haptens d'immunització (PSau6 i PSau8) es va conjuguar a una biomacromolècula i es va immunitzar per duplicat a conills blancs de varietat New Zealand. En tractar-se d'antígens de baix pes molecular era necessari el disseny d'haptens d'immunització per tal de poder-los conjuguar a macromolècules capaces d'induir una resposta immune a l'animal hoste. Un cop obtinguts els corresponents antiserums (As288, As289, As290 i As291) es va procedir a l'avaluació dels anticossos policlonals mitjançant ELISAs. Tots els detalls de la producció dels anticossos i la seva avaluació es recullen tant en la publicació II (vegeu apartat 3.4.1) com en la publicació III (vegeu apartat 3.4.2).

3.2.3 DESENVOLUPAMENT I AVALUACIÓ D'UN ELISA EN FORMAT DE MICROPLACA PER A LA DETECCIÓ DE *S. aureus*

Finalment, els anticossos es van implementar en un assaig de tipus ELISA en format de microplaca per a la detecció del PG de *S. aureus*. L'assaig es va caracteritzar estudiant les condicions fisicoquímiques (pH, força iònica i tant per cent Tween® 20) del tampó de competència de l'assaig així com també els temps de competència i preincubació de l'anàlit amb l'anticòs. I un cop restablertes les condicions més favorables de l'assaig, es va procedir a fer un estudi sobre la utilitat d'aquesta eina analítica aplicant-lo a l'anàlisi de mostres de cultius cel·lulars de *S. aureus* en mostres de tampó i mostres biològiques d'origen respiratori (BAL i BAS). Els detalls d'aquest treball es recullen tant en la publicació II (vegeu apartat 3.4.1) com en la publicació III (vegeu apartat 3.4.2).

3.2.4 ESTUDIS PRELIMINARS PER AL DESENVOLUPAMENT D'UNA MICROMATRIU PER A LA DETECCIÓ DE *S. aureus*

D'altra banda, els anticossos desenvolupats també es van implementar en un assaig de tipus micromatriu per a la detecció del PG de *S. aureus*. Els estudis preliminars obtinguts per al desenvolupament d'una micromatriu que es recullen en l'apartat 3.3.4 demostren la possibilitat d'obtenir immunoassajos de tipus micromatriu en diferents formats d'assaig amb els quals es podria seguir treballant per millorar els resultats si es volgués seguir en aquesta direcció.

3.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.3.1 DESENVOLUPAMENT D'ANTICOSSOS ESPECÍFICS PER A LA DETECCIÓ DE *S. aureus*

Després d'un estudi bibliogràfic exhaustiu i tenint en compte les consideracions citades a l'apartat 2.5, es va decidir produir els anticossos contra la part peptídica del PG, la qual conté un pont de cinc glicines específic de *S. aureus*.

Basant-nos en els estudis previs de l'estructura del PG^{84,134,135} es varen dissenyar dos pèptids *PSau5* i *PSau7* (vegeu Figura 3.4 i Figura 1 de la publicació III a l'apartat 3.4.2), els quals mimetitzaven la part específica del PG de *S. aureus*. El PG de *S. aureus* té una unitat estructural repetitiva formada per cadenes de GlcNAc-MurNAc entrelaçades entre elles per una part proteica com s'ha descrit en l'apartat 3.3.4. Tot i els estudis acurats sobre l'estructura química del PG resta encara certa incertesa quant al grau de ramificació; per aquest motiu es va dissenyar el *PSau5* on l'*stem peptide* presentaria una sola ramificació i el *PSau7* on representaria una unitat doblement ramificada.

A causa del baix pes molecular d'aquest epítops peptídics seleccionats, es van dissenyar dos haptens d'immunització, *PSau6* i *PSau8* (vegeu Figura 3.3 i Figura 1 de la publicació III a l'apartat 3.4.2), als quals s'ha introduït una cisteïna (Cys) addicional, per tal de poder-los conjuguar a una biomacromolècula d'elevat pes molecular i induir la resposta immune de l'animal hoste. En aquest cas concret, es van fer servir dues proteïnes, la HCH i la BSA, les quals van ser modificades amb el pèptid mitjançant l'ús d'agents heterobifuncionals com ara el 3-maleimidopropanoat de succinimida (N-SMP, *N-succinimidyl 3-maleimidopropionate*) o el iodoacetat de N-succinimida (N-SIA, *N-succinimidyl iodoacetate*). Els conjugats a HCH es van fer servir com a haptens d'immunització i els conjugats a BSA com a haptens de competició per al desenvolupament dels assajos competitius explicats més endavant (vegeu els apartats a i 3.3.4a).

La immunització de dos conills blancs de tipus New Zealand per a cada un dels bioconjugats de HCH va permetre obtenir els antisèrums As288 i As289, de la immunització amb *PSau6*-HCH, i els antisèrums As290 i As291, de la immunització amb *PSau8*-HCH.

Tots els pèptids emprats en el treball que es descriu en aquest capítol 3 i que es resumeixen a la Figura 1 de la publicació III (vegeu apartat 3.4.2) han estat sintetitzats per la Unitat de Síntesi Combinatòria dirigida per la Dra. Miriam Royo.

a ESTABLIMENT D'UN IMMUNOASSAIG DE TIPUS ELISA PER A LA DETERMINACIÓ DE *S. aureus*

Després d'obtenir els anticossos policlonals es va procedir a la seva avaluació i establiment d'un assaig de tipus ELISA en format de microplaca. El procés d'establiment d'un protocol d'ELISA per a la detecció del PG de *S. aureus* va requerir en primer lloc escollir les concentracions més adients dels quatre antisèrums obtinguts (As288, As289, As290 i As291) i dels quatre competidors sintetitzats (PSau3-BSA, PSau4-BSA, PSau6-BSA i PSau8-BSA). I a continuació, desenvolupar un ELISA competitiu indirecte en tampó emprant PG comercial com a estàndard, del qual es van estudiar les condicions físicoquímiques de l'assaig per tal d'assolir la màxima detectabilitat i conèixer el comportament de l'assaig sota diferents condicions.

Com a resultat de tots aquest estudis es va aconseguir desenvolupar un ELISA (As291/PSau3-BSA) capaç de detectar PG amb un LOD de $120 \pm 90 \text{ ng mL}^{-1}$ (vegeu Taula 1 i Figura 2A de la publicació III de l'aparta 3.4.2). No obstant això, arran de l'heterogeneïtat de les mostres comercials de PG, es va decidir utilitzar com a referència els epítops peptídics seleccionats, que a diferència del PG eren molècules pures d'origen sintètic i amb estructures ben definides. Concretament, es va seleccionar el PSau7, tot i que la resposta del PSau5 era similar (vegeu Figura 2B de la publicació III). D'aquesta manera, la resposta de l'assaig davant la presència del microorganisme es mesuraria en termes d'equivalents d'immunoreactivitat de PSau7 (PSau7 IR equiv.) La detectabilitat assolida en termes de PSau7 IR equiv. va ser de $0,10 \pm 0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ ($0,09 \pm 0,01 \text{ nM}$) (vegeu Taula 1 i Figura 2 de la publicació III). Malgrat tot, per tal de conèixer el valor del nostre ELISA com a eina de diagnòstic era necessari conèixer quina era la detectabilitat en termes de CFU mL⁻¹, per la qual cosa es va procedir a aplicar el mètode desenvolupat a l'anàlisi de mostres provinents de cultius de *S. aureus* com s'explicarà més endavant (vegeu els apartats 3.3.2 i 3.3.2).

3.3.2 ANÀLISI DE MOSTRES PROVINENTS DE CULTIUS DE *S. aureus*

Aquest treball va ser possible gràcies a la col·laboració establerta amb el grup de Microbiologia Aplicada de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) liderat pel Prof. Antoni Villaverde, que ens va facilitar unes suspensions de *S. aureus* (CECT 5190) a diferents concentracions i inactivades per calor a 100°C. L'objectiu d'aquests experiments era fonamentalment comprovar que l'ELISA As291/PSau3-BSA era

capaç de quantificar mostres de *S. aureus* de manera directa. A més, poder establir una relació entre les CFU mL⁻¹ i els PSau7 IR equiv. aportava informació rellevant.

Malauradament, els resultats inicials no van ser del tot satisfactoris, ja que la detectabilitat assolida era tan sols de 10⁷ CFU mL⁻¹. Aquest valor no és de gaire utilitat per al diagnòstic clínic i és molt superior al d'altres tècniques immunoquímiques reportades (vegeu apartat 3.1.5). Entre les hipòtesis que vam considerar per donar explicació a aquesta manca de detectabilitat hi havia el fet que l'epítop podia estar molt amagat dins l'estructura de la paret bacteriana, a la vegada protegida per la capsul·la. Així doncs, amb la finalitat d'augmentar la detectabilitat del mètode, vam procedir a estudiar diferents mètodes per trencar la paret bacteriana, esperant que la fragmentació de la paret millorés l'accessibilitat del pèptid. A continuació es descriuen alguns dels mètodes emprats.

a *Trencament de la paret bacteriana*

A la bibliografia trobem una àmplia informació de mètodes per al trencament de la paret bacteriana, el quals podem classificar en tres grans grups: físics, químics i enzimàtics.

Els **mètodes físics** van ser els primers recursos que es van utilitzar. Són mètodes no específics entre els quals trobem: el tractament amb ultrasons (generalment emprat per a l'aïllament de membranes, de PG o proteïnes¹³⁶), la disrupció a alta pressió (l'aparell més comú és la premsa francesa on una suspensió de bacteris col·loca dintre d'un cilindre de metall i se sotmet a una pressió de 20.000 psi^{136,137}), l'homogenitzador de boles de vidre de 0,1-0,2 mm de diàmetre on les cèl·lules es trenquen mitjançant l'agitació vigorosa de les boles barrejades amb les cèl·lules¹³⁶ o el làser (els bacteris s'irradien amb el làser i la paret es trenca per termòlisis^o, seguint procediments descrits¹³⁸; a vegades també s'afegeixen nanopartícules metàl·liques i s'irradia a la longitud d'ona del plasmó¹³⁹). Vegeu Figura 3.6 on es mostren fotografies dels diferents aparells emprats en els mètodes físics. El sistema de làser és la tècnica més nova de totes elles i malgrat les contínues publicacions on s'empra aquesta tècnica per a la lisi de bacteris actualment no hi ha un instrument disponible al mercat, sinó que es tracta de sistemes casolans.

^o TERMÒLISI: Descomposició d'una substància per acció de el calor.

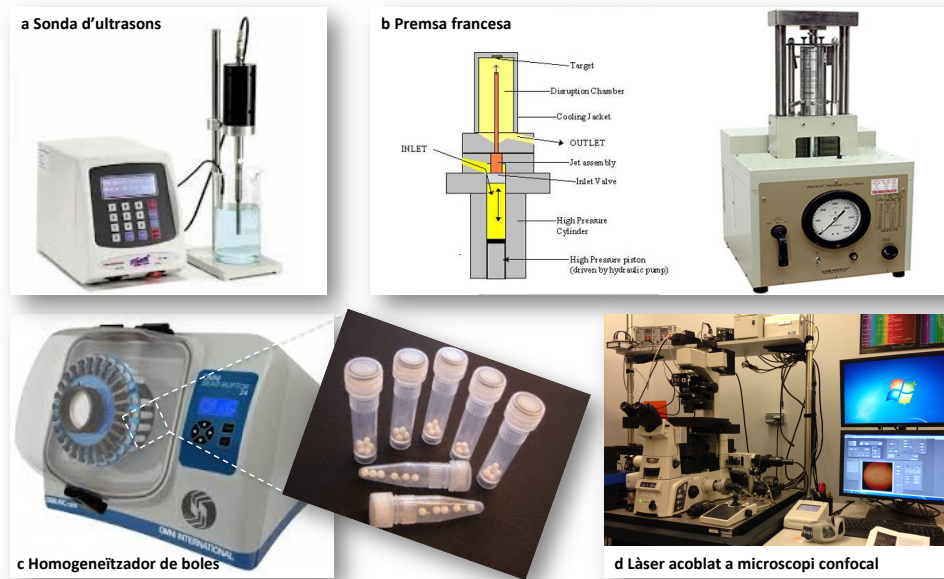


Figura 3.6 Fotos del diferents aparells per lisar bacterïes mitjançant mètodes físics. **a)** Sonda d'ultrasons **b)** Premsa francesa **c)** Homogeneïtzador de boles i **d)** Làser acoblat a microscopi confocal de l'institut de fòtonica (fotografia realitzada a l'Institut de Ciències Fotòniques, ICFO).

Els **mètodes químics** tenen l'avantatge de poder controlar el tipus d'enllaç que es trenca sense necessitat de ser completament específic com el cas de l'acció d'enzims. D'una banda, trobem la hidrazinòlisi i la β -eliminació alcalina, que deixen els glicans intactes però per contra destrueixen el component proteic de la paret. De l'altra, trobem l'àcid trifluorometansulfònic (TFMSA, *trifluorometane sulfonic Acid*)^{140,141} o el fluorur d'hidrogen gas, els quals destrueixen els glicans però deixen intactes l'enllaç amida peptídic^{142,143}.

Pel que fa als **mètodes enzimàtics**, aquests són altament específics i més suaus. En contraposició dels mètodes químics, no hi ha cap enzim identificat que sigui capaç de trencar tots els tipus de glicans i petites modificacions de l'enllaç poden inhibir l'activitat enzimàtica, desavantatge considerable quan s'han d'analitzar glicoproteïnes no caracteritzades. Uns altres inconvenients són els llargs temps de reacció que es necessiten i la desconexença de les condicions de reacció segons els tipus de substrat a tractar.

Amb aquests precedents, vam avaluar alguns dels mètodes descrits. En una primera instància, es va avaluar l'efecte de l'acció del làser irradiant solucions aquoses d'extracte de PG i suspensions de *S. aureus* amb un làser de 1.550 nm de longitud d'ona en col·laboració amb el grup del Prof. Pablo Loza de l'ICFO (Institut de Ciències Fotòniques, Castelldefels). També es va avaluar l'efecte dels ultrasons sometent solucions aquoses d'extracte de PG i suspensions de *S. aureus* a diferents amplituds i

temps d'ultrasonicació. Pel que fa als mètodes enzimàtics, les mateixes suspensions es van tractar amb lisosima i mutanolisina.

Les solucions aquoses d'extractes de PG i suspensions de *S. aureus* tractades amb tots aquests procediments van ser avaluades amb l'ELISA As291/PSau3-BSA per tal de saber si algun d'aquests tractaments permetia millorar la detectabilitat. Per bé que alguns d'aquests mètodes han demostrat ser eficients per al trencament de la paret bacteriana, els resultats que nosaltres obtinguérem no mostraven diferències en termes de detectabilitat de l'assaig comparant les mostres tractades i no tractades tal com es mostra en la Figura 3.7 pel cas particular del tractament amb làser. La Figura 3.7 A demostra que el tractament amb làser no malmet el PSau7, l'epítip a detectar, no obstant això, el tractament tampoc implica modificacions de l'estructura del PG que es puguin traduir en millores de detectabilitat de l'assaig As291/PSau3-BSA (vegeu Figura 3.7 B), de manera que les corbes de PG i PG tractat amb el làser són pràcticament superposables.

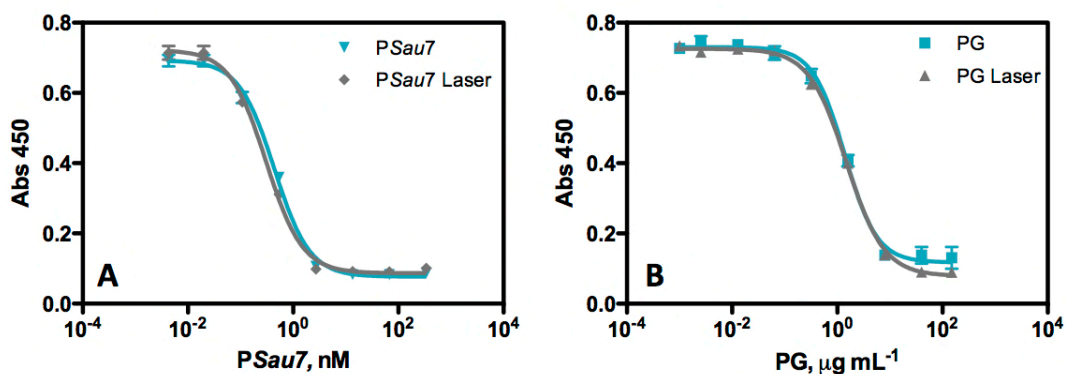


Figura 3.7 A. Corbes de calibratge generades amb el PSau7 i el PSau7 tractat amb làser. **B.** Corbes de calibratge del PG i el PG tractat amb làser.

Per consegüent, es va decidir procedir a l'avaluació d'un mètode químic consistent en l'ús de TFMSA. El peptidoglicà és una macromolècula no cristal·litzable i de la qual es desconeix el pes molecular, fet que dificulta el seguiment dels tractaments que s'apliquen sobre aquesta mostra i la seva caracterització en general. A fi de garantir que el tractament amb TFMSA s'estava duent a terme correctament, en primer lloc es va assajar el tractament amb la fetuïna bobina, una proteïna present al torrent sangüini de la qual a la bibliografia es reporten deglicosilacions amb el TFMSA^{140,144}. Es va afegir una mescla de anisol-TFMSA (1:2) sobre la fetuïna bobina en condicions d'atmosfera de nitrogen i després del tractament de neutralització i extracció de la proteïna es van analitzar els resultats per MALDI-TOFF/TOFF-MS, i es va observar que el pes molecular de la fetuïna bobina de referència (PM=44.032,014) era inferior al pes molecular de la fetuïna bobina deglicosilada

(PM=40.000,68). Aquest fet que ens permetia concloure que el tractament va ser realitzat amb èxit.

Així doncs, atès que cap dels tractaments utilitzats van proporcionar els resultats esperats excepte pel cas del TFMSA, es va seguir endavant amb aquest procediment. El tractament químic obligava a canviar les condicions de l'assaig, la qual cosa produïa una disminució de la detectabilitat del PSau7 ($LOD_{PBST-D} 1,37 \pm 0,09$ nM vs $LOD_{PBST} 0,09 \pm 0,01$ nM, vegeu Figura 2 i Taula 1 de la publicació III), tot i que l'increment de detectabilitat observat tant en les mostres de PG com en les suspensions de *S. aureus*, que ara es podien detectar fins a 10^4 CFU mL⁻¹ (vegeu Figures 3 i 4 de la publicació III), ens van encoratjar a abordar la implementació de l'assaig a l'anàlisi de mostres clíniques (vegeu apartat 3.3.3).

Adicionalment, i amb l'objectiu de comprovar si veritablement es produïa un trencament del bacteri, també es van fer alguns estudis per microscòpia confocal (vegeu a continuació apartat b).

b Detecció de les mostres amb un microscopi confocal

Després de provar diferents mètodes de trencament volíem comprovar com es veien les bactèries marcades fluorescentment al microscopi i alhora veure si podíem apreciar algun tipus de trencament de la paret. Amb aquest propòsit es van preparar portaobjectes biofuncionalitzats covalentment amb l'As291 seguint el procediment que s'explica més endavant per fabricar micromatrius (vegeu part experimental, apartat 3.7) i es va portar a terme un assaig de tipus sandvitx (vegeu més endavant apartat 3.2.4). La Figura 3.8 mostra com només *S. aureus* és reconegut per l'As291, i alhora podem observar la paret de *S. aureus* marcada fluorescentment, però en cap cas podem apreciar irregularitats de la paret després de ser tractades amb els làser o els ultrasons, ja sigui perquè són irregularitats no observables o bé perquè els fragments més petits no els detectem amb el format tipus sandvitx. Els portaobjectes s'han observat en dos microscopis, un primer microscopi d'il·luminador de camp fosc d'alta resolució, el CytoViva® del departament de Nanobiotechnologia i Química Biològica (NQB, IQAC-CSIC), i un segon microscopi confocal, l'E1000 del sevei de microscòpia del Parc Científic de Barcelona (PCB). Aquests tipus d'estudis no van proporcionar informació addicional i per tant les decisions es va fer en base a la resposta immunoquímica dels extractes tractats.

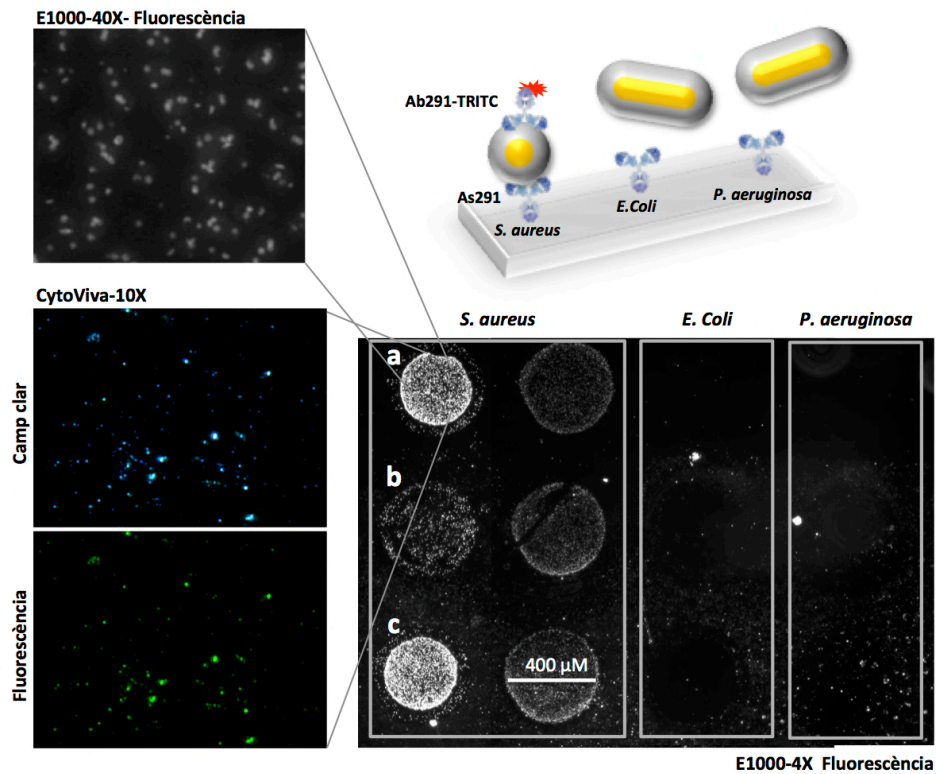


Figura 3.8 Imatges obtingudes dels diferents bacteris en un microscopi confocal E1000 i CytoViva®. Per a *S. aureus* s'han fet dúpliques (disposades horitzontalment sobre el portaobjectes) de bacteris sense tractar (a), tractats amb làser (b) i ultrasons (c).

3.3.3 ANÀLISI DE MOSTRES DE BAL I BAS DOPADES AMB *S. aureus*

Amb l'objectiu d'aplicar els protocols anteriors a mostres clíniques, i tenint en compte la rellevància del patògen *S. aureus* en pacients amb problemes respiratoris, es va procedir a avaluar el tractament de deglicosilació en mostres de BAL (rentats broncoalveolars) i BAS (broncoaspirats) obtingudes com a resultat de la col·laboració establerta amb el Servei de Microbiologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona liderat pel Dr. Vicent Ausina.

Per adaptar l'immunoassaig a mostres de BAL i de BAS es van preparar dues barreges (*pool*), mesclant per a cadascuna de les barreges 10 espècimens procedents de pacients no colonitzats amb *S. aureus*. Cadascun del *pools* es van deglicosilar seguint el protocol establert i després se'n va estudiar el tipus de resposta inespecífica que produïen en l'ELISA As291/PSau3-BSA. Tal com mostra la Figura 2B de la publicació III, l'efecte matriu de les mostres de BAL i BAS deglicosilades (corbes BAL i BAS delgi.) és pràcticament inapreciable si les comparem amb la corba de tampó deglicosilat (PSau7 PBST-D). La Taula 1 de la mateixa publicació recull els paràmetres dels immunoassajos en matriu als quals s'ha aplicat un factor de multiplicació de 2,5 sobre els valors de IC₅₀s i LODs a causa

del factor de dilució provinent del tractament de deglicosilació. En resum, el LOD de PSau7 en aquestes mostres d'origen respiratori deglicosilades és de $19,08 \pm 7,35$ nmol Kg⁻¹ de BAL i de $18,80 \pm 3,70$ nmol Kg⁻¹ de BAS.

Considerant que els resultats havien estat satisfactoris, es va procedir a l'anàlisi de mostres de BAL i BAS dopades amb *S. aureus*. Com es pot observar en la Figura 4 de la publicació III, la resposta immunoquímica per a les mostres de BAL i BAS va ser molt semblant als resultats obtinguts per a les mostres de *S. aureus* dopades i deglicosilades en tampó (columna PBST-D). Tanmateix, el LOD assolit per a les mostres respiratòries era lleugerament inferior (10^5 pel BAS i 10^6 pel BAL), possiblement relacionat amb algun efecte d'interferències no específiques provinent de les respectives matrius. Tot i així, els resultats obtinguts tenen una gran rellevància per al diagnòstic de les malalties infeccioses ja que la tècnica desenvolupada no requereix el preenriquiment de la mostra i per tant implica una millora significativa quant a temps de diagnòstic respecte als mètodes actuals. Amb tot, si es volgués seguir treballant en la millora del LOD assolit per a aquest tipus de mostres respiratòries es podrien explorar altres tractaments de mostra alternatius als aquí presentats.

3.3.4 ESTABLIMENT D'UN IMMUNOASSAIG DE TIPUS MICROMATRIU PER A LA DETECCIÓ DE *S. aureus*

Durant els experiments en què es mesuraven les suspensions de *S. aureus* provinents dels cultius cel·lulars, es van observar problemes d'adsorció inespecífica en les microplaques de poliestirè emprades com a suport en l'assaig de tipus ELISA. A fi de minimitzar aquest efecte, es va decidir provar altres superfícies com ara el vidre i implementar l'assaig en format de micromatriu. Aquest format ens aportava dos avantatges: per una banda, la possibilitat de minimitzar l'adsorció inespecífica i, per l'altra, la possibilitat d'explorar una opció vàlida per al futur desenvolupament d'una plataforma multiplexada per poder detectar un mínim de tres microorganismes simultàniament, atès que aquest és també un dels grans interessos en el camp de la detecció de patògens.

A diferència de l'ELISA, en el format de micromatriu la immobilització de les proteïnes a la superfície de vidre va ser de tipus covalent. Els grups amino disponibles en els residus de lisina de les proteïnes han estat usats àmpliament per crear unions covalents sobre superfícies de vidre a través de la reacció amb àcids carboxílics, aldehids, epòxids o altres amines¹⁴⁵. En el nostre cas, les superfícies varen ser inicialment activades submergint els portaobjectes en una solució de NaOH al 10% (p/w) durant 1 h a temperatura ambient, i a continuació derivatitzades

amb (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilà (GPTMS, (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane) durant 1 h tal com s'esquematitza a la Figura 3.9 (per més detalls vegeu part experimental).

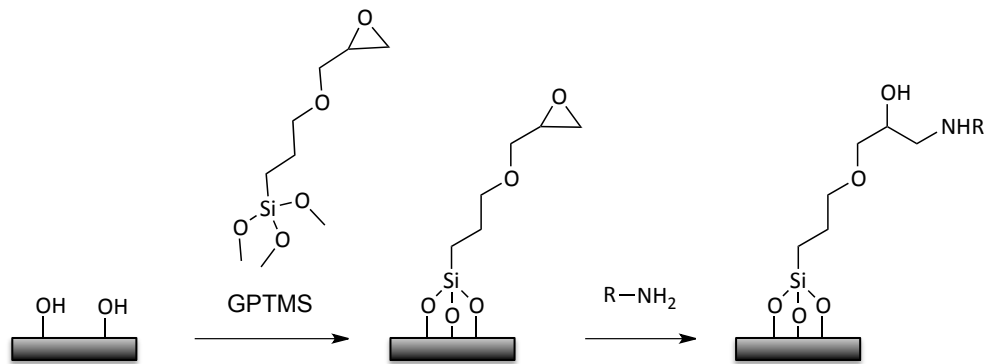


Figura 3.9 Esquema de la funcionalització del vidre amb GPTMS

a Establiment d'una micromatriu de format indirecte competitiu per a la detecció de PG, PSau7 i *S. aureus*

Un cop els portaobjectes estaven funcionalitzats amb l'epoxisilà, aquests es van fer servir per desenvolupar una micromatriu de format indirecte. De la mateixa manera que en el format ELISA, en primer lloc, cal establir les concentracions d'Ag de tapissat i d'As adequades mitjançant un experiment bidimensional (2D) on es varia tant la concentració d'antígen com la dilució de l'anticòs. L'Ag es va immobilitzar de forma covalent a través del grup epòxid del GPTMS mitjançant un dispensador de nanogotes (*spotter*), que forma una matriu de zones micromètriques (punts o *spots*) funcionalitzades.

En representar la fluorescència en unitats relatives (RFU, *relative fluorescence units*) mesurades en funció de la concentració d'Ag s'obté el tipus de gràfica representada en la Figura 3.10. Les concentracions que es van escollir per al desenvolupament del format competitiu van ser $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PSau3-BSA i una dilució 1/50 d'As291. El criteri emprat va ser seleccionar aquelles concentracions d'immunoreactius que estan aproximadament al 75% de saturació de la corba i el senyal de fluorescència està al voltant de 2500-3000 RFU.

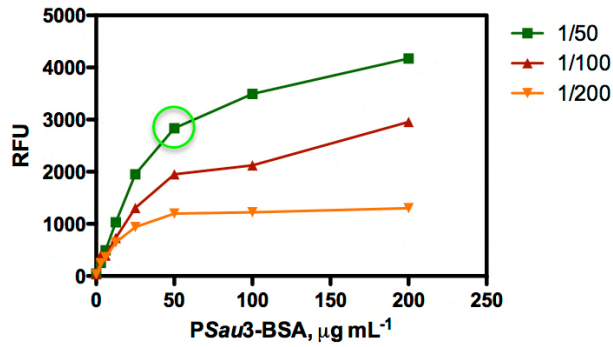


Figura 3.10 Resultats obtinguts en els experiments no competitiu de tipus 2D en format de micromatriu.

Utilitzant les concentracions d'immunoreactius seleccionades, es van realitzar els assajos competitiu examinant el comportament de l'assaig amb diferents solucions estàndards PG, PSau7 i *S. aureus* (vegeu protocol a la part experimental), i es va observar competència en els tres casos. La quantificació mitjançant l'escàner de fluorescència ens va permetre elaborar les corresponents corbes de competència per a l'assaig As291/PSau3-BSA (vegeu Figura 3.11 per PG, Figura 3.12 per PSau7 i Figura 3.13 per *S. aureus* com a solució estàndard).

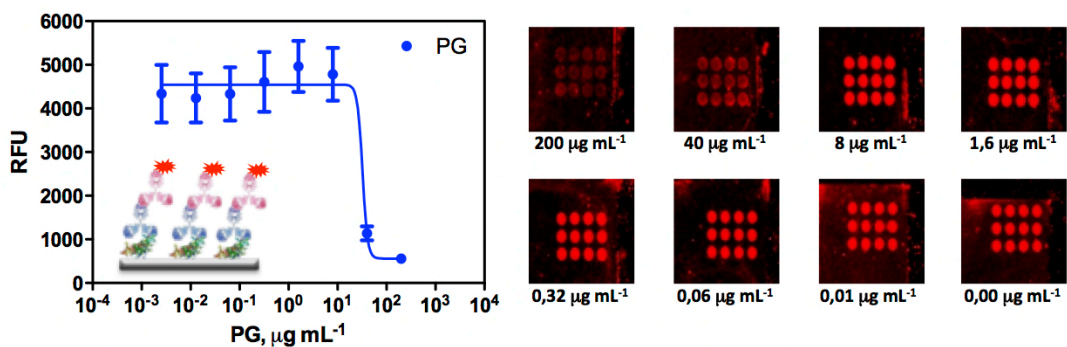


Figura 3.11 Resultats obtinguts pel que fa a la determinació de PG amb l'assaig As291/PSau3-BSA en format de micromatriu emprant solucions de PG de *S. aureus* com a estàndard. La grandària dels punts és d'aproximadament 100 micròmetres.

La Taula 3.4 mostra els paràmetres obtinguts pels assajos competitiu en format de micromatriu. Comparant aquests resultats amb l'ELISA en microplaca, la detectabilitat empitjora tant pel PG de *S. aureus* com pel PSau7, ja que s'obté en ambdós casos IC₅₀s de l'ordre del µg mL⁻¹, mentre que en format ELISA s'ha arribat al ng mL⁻¹. Pel que fa a la detecció de *S. aureus*, es va obtenir una bona corba de calibratge amb un LOD de $1,95 \cdot 10^6 \pm 0,28$ CFU mL⁻¹ (vegeu Taula 3.3), el qual és significatiu però desitjablement millorable si es vol obtenir un assaig que sigui competitiu per implementar-lo en l'àmbit clínic. Per altra banda, la variabilitat entre els punts de la micromatriu és superior a la variabilitat entre pous de l'ELISA. La falta d'homogeneïtat tant en la densitat com en la morfologia dels punts en el cas de les

micromatrius de proteïnes és un tema molt estudiat i que comporta haver d'optimitzar amb molta cura les condicions d'immobilització amb tampons que incorporin agents específics i que permetin que una distribució homogènia de la proteïna. Amb l'objectiu de controlar aquesta variabilitat en l'assaig competitiu de *S. aureus* es va decidir introduir una fila de punts que ens donés un senyal que hauria de ser constant en cada una de les diferents matrius (*arrays*) d'un mateix portaobjectes i si era necessari també ens permetés normalitzar els senyals obtinguts entre matrius. Amb aquesta finalitat, en les últimes dues files de l'assaig competitiu de *S. aureus* es va immobilitzar una concentració constant d'un anticòs policlonal que seria reconegut per l'anticòs secundari anti-IgG-TRITC. En conseqüència, obteníem un senyal que ens permetia normalitzar la fluorescència dels punts entre matrius i minimitzar la variabilitat intrínseca de les micromatrius, com queda reflectit en la disminució de variabilitat dels paràmetres de l'immunoassaig de *S. aureus* respecte PG o PSau7 (vegeu Taula 3.3).

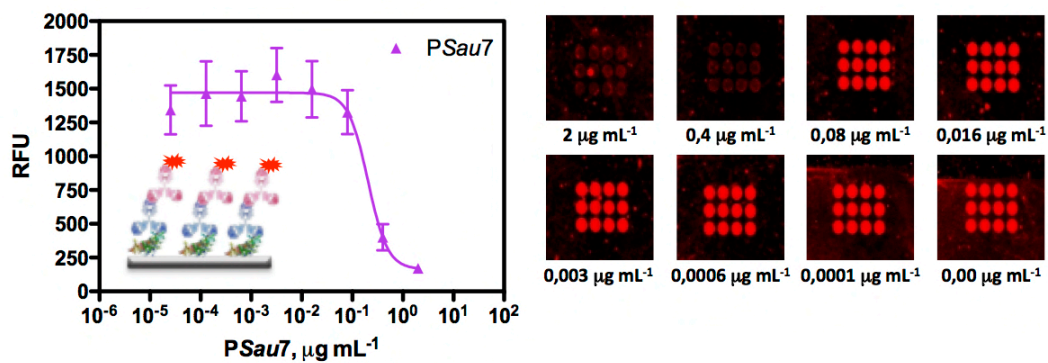
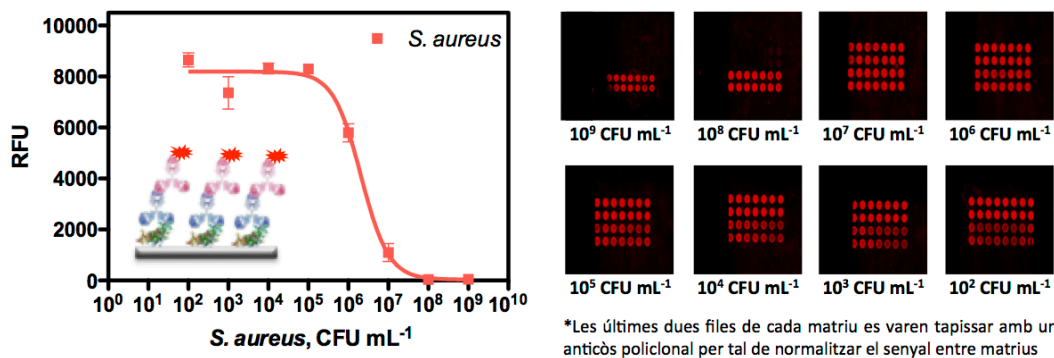


Figura 3.12 Resultats obtinguts pel que fa a la determinació de **PSau7** en l'assaig As291/PSau3-BSA en format de micromatriu emprant solucions de PSau7 sintètic com a estàndard. La grandària dels punts és d'aproximadament 100 micròmetres.



*Les últimes dues files de cada matriu es varen tapissar amb un anticòs policlonal per tal de normalitzar el senyal entre matrius

Figura 3.13 Resultats obtinguts pel que fa a la determinació de **S. aureus** en l'assaig As291/PSau3-BSA en format de micromatriu emprant solucions de *S. aureus* procedents de medi de cultiu i diluïdes amb tampó com a estàndard. La grandària dels punts és d'aproximadament 100 micròmetres.

Tots els detalls experimentals del desenvolupament dels assajos de micromatriu en format competitiu indirecte es detallen en l'apartat 3.7. Aquests són resultats preliminars que no han estat publicats en cap revista científica i en vista dels resultats obtinguts en ELISA tot fa pensar que en el format de micromatriu es podria optimitzar per assolir detectabilitats menors. Alguns exemples podrien ser preparar un bioconjugat amb una densitat d'haptè més alta, millorar les condicions d'immobilització sobre la placa o l'ús d'altres cromòfors amb longituds d'ona més properes a la del làser emprat, ja que la longitud del làser de l'escàner era de 543 nm i l'excitació ideal de la TRITC és a 532 nm.

b Establiment d'una micromatriu en format sandvitx per a la detecció de *S. aureus*

Tenint en compte que *S. aureus* té una mida d'1 µm de diàmetre ens vam plantejar també l'opció d'explorar el format sandvitx. En aquest format es va decidir marcar l'anticòs de detecció amb un fluoròfor per evitar el fet d'afegir un anticòs secundari (anti-IgG-marcats) que ens pogués reconèixer tant l'anticòs de captura com el de detecció, atès que ambdós anticòs són policlonals de conill. Al mateix temps, marcant l'anticòs de detecció permet escurçar la durada de l'assaig. A continuació es descriu el resultat de la recerca realitzada en aquesta direcció així com en l'apartat 3.7 se'n donen els detalls experimentals. Els resultats descrits a continuació no han estat publicats en cap revista científica.

El fluoròfor que es va escollir per conjuguar l'anticòs 291 va ser la rodamina principalment per dos motius. En primer lloc, atenent als requeriments de l'escàner emprat per a la lectura de les micromatrius, vist que es disposava d'un làser verd de 543 nm. En segon lloc, gràcies a la disponibilitat comercial d'aquest fluoròfor amb diferents funcionalitats químiques. Per a la nostra aplicació, era necessari que la molècula fluorescent disposés d'algun grup mitjançant el qual es pogués conjuguar covalentment a l'anticòs, fet que ens va portar a seleccionar l'isocianat de la tetrametilrodamina (TRITC, *tetramethyl rhodamine isothiocyanate*) que forma el tiocarbamat de rodamina en conjugar-se als grups amino de les lisines de l'anticòs (vegeu Figura 3.14).

Per a la conjugació es va emprar anticòs purificat per sulfat i posteriorment per proteïna A. El primer pas de purificació es va fer amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45% seguint procediments ja descrits¹⁴⁶ (vegeu apartat 3.7), amb aquest grau de saturació precipiten quasi totes les IgGs del sèrum, i algunes altres proteïnes com les albúmines. Aquesta contaminació d'altres proteïnes no és rellevant si després es pretén seguir purificant l'anticòs per altres mètodes més específics com va ser el

cas, en què es va aplicar un segon grau d'immunopurificació per proteïna A. La conjugació de l'anticòs a TRITC va tenir lloc en tampó carbonat/bicarbonat durant 2 h. Per tal d'assegurar la biofuncionalitat, es van preparar dos bioconjugats, el conjugat 1 amb una relació molar Ab:TRITC de 1:1,8 i el conjugat 2 de 1:2,5.

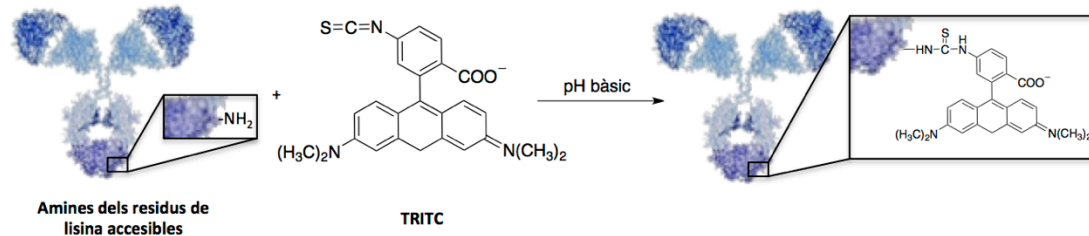


Figura 3.14 Esquema de la reacció de conjugació d'un anticòs a TRITC. L'anticòs te 30-35 de residus de lisina accessibles.

Per a la caracterització dels conjugats Ab291-TRITC es va seguir el protocol descrit per la casa comercial Thermo Scientific¹⁴⁷, que consisteix a calcular primer la molaritat de la proteïna i a continuació el grau de conjugació tal com es detalla a la part experimental d'aquest capítol (vegeu apartat 3.7). Com a resultat d'aquests càlculs es va poder evidenciar que els bioconjugats preparats estaven marcats amb TRITC amb relacions baixes, tal com era d'esperar; 1:1,2, pel cas del conjugat 1 i 1:1,5 pel cas del conjugat 2 (vegeu Taula 3.2), i es minimitzava d'aquesta manera la possibilitat que la biofuncionalització hagués tingut lloc a través dels centres actius de l'anticòs, la qual cosa n'afectaria la biofuncionalitat.

Taula 3.2 Densitat de fluoròfor del conjugats Ab291-TRITC.

Conjugat	1	2
Ràtio Ab:TRITC teòric	1:1,8	1:2,5
Ràtio Ab:TRITC calculat	1:1,2	1:1,5

Pel que fa al format tipus sandvitx, es van preparar matrius de 6 columnes x 4 files immobilitzant l'As291 (dilució 1/50 en tampó d'impressió) i una fila amb PSau3-BSA per normalitzar el senyal entre matrius en vista de la millora significativa que aportava aquesta mesura en l'experiment competitiu de *S. aureus* (vegeu apartat a anterior). Les concentracions d'immunoreactius es van seleccionar en base a experiments bidimensionals descrits en l'apartat a pel format competitiu.

En tractar-se d'un format de tipus sandvitx, l'anticòs de detecció (Ab-TRITC) només podrà detectar aquells anàlits de mida prou gran que en ser reconeguts pel primer anticòs no hagin quedat totalment emmascarats pel centre actiu del mateix anticòs. Tenint en compte aquest aspecte, vam decidir analitzar únicament les mostres de suspensions bacterianes proporcionades pel grup del Prof. Villaverde. Els resultats

de l'assaig tipus sandvitx ajustats a una equació logística de quatre paràmetres es mostren a la Figura 3.15. Tanmateix, en tractar-se d'un assaig no competitiu el LOD es va calcular com a $\bar{X}_{\text{blancs}} \pm 3 \text{ SD}$, on \bar{X}_{blancs} és la mitjana aritmètica dels blancs i SD és la desviació estàndard associada, ja que no tenia sentit calcular-lo com a la IC_{90} en casos anteriors. El LOD extret de l'equació era de 10^4 CFU mL^{-1} , i assolia un LOD de l'ordre dels obtinguts amb el tractament de la paret cel·lular amb TFMSA en ELISA tal com es detalla a l'apartat 3.3.2a. Seria d'esperar que el tractament amb TFMSA millorés encara molt més la detectabilitat però cal tenir en compte que aquest format pot no ser adequat per quantificar els extractes després d'esser tractats amb TFMSA, ja que si els fragments alliberats amb l'àcid fossin massa petits no es podrien detectar en un format sandvitx. Aquest és un tema que hauria de ser estudiat amb més detall si es decidís continuar en aquesta direcció.

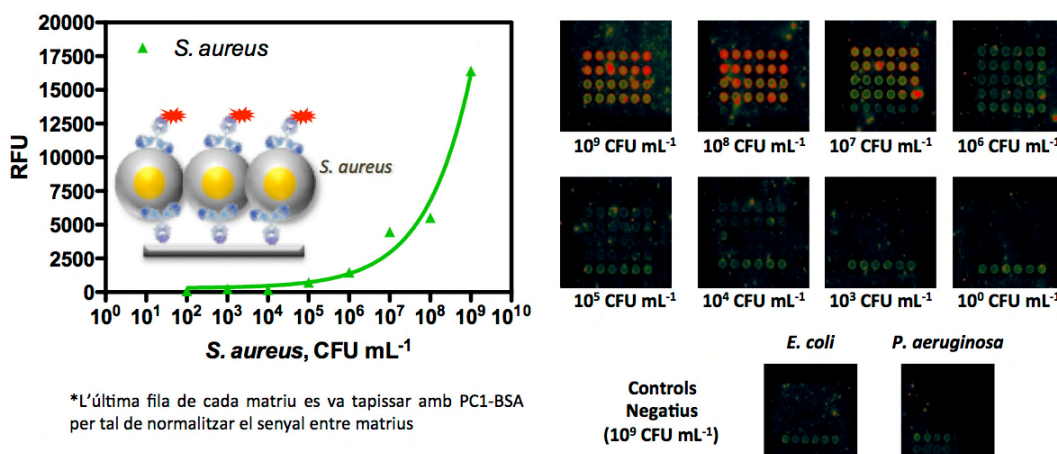


Figura 3.15 Resultats obtinguts en l'assaig As291/*S. aureus*/Ab291-TRITC de tipus micromatriu en format sandvitx emprant solucions de *S. aureus* com a estàndard. La grandària dels punts és d'aproximadament 100 micròmetres.

Taula 3.3 Paràmetres dels immunoassajos emprant PG, PSau7 i *S. aureus* en tampó com a estàndards en format de micromatriu. Les corbes de PG i PSau7 estan preparades en PBT i les de *S. aureus* en PBST.

Analit➤	PG	PSau7	<i>S. aureus</i>	
Format➤	Competitiu	Competitiu	Competitiu	Sandvitx
Senyal _{max}	4544 ± 1063	3930 ± 1187	8194 ± 79,49	16415 ± 125
Senyal _{min}	581 ± 85,1	94,91 ± 47,12	35,20 ± 114,2	94,97 ± 50,99
Pendent	-20,28 ± 0,06	-2,071 ± 1,307	-1,26 ± 0,09	-
IC ₅₀	27,99 ± 9,781 ^a	0,238 ± 0,033 ^a	1,89 10 ⁷ ± 1,08 ^b	-
LOD	20,89 ± 4,872 ^a	0,027 ± 0,004 ^a	1,95 10 ⁶ ± 0,28 ^b	10 ⁴ ± 90 ^b
R ²	0,972 ± 0,019	0,9801 ± 0,003	0,931 ± 0,154	0,973 ± 0,005

Les dades mostrades són la mitjana i la desviació estàndard dels paràmetres de l'ajust de les corbes de calibratge d'un dia amb diverses rèpliques dins la micromatiru. ^a Els valors s'expressen en $\mu\text{g mL}^{-1}$ ^b Els valors s'expressen en CFU mL^{-1}

3.4 PUBLICACIONES RELACIONADAS

3.4.1 PUBLICACIÓ II: COMPOSTOS I ELS SEUS USOS COM A HAPTENS PER A LA DETECCIÓ DE *Staphylococcus aureus*

**Compuestos y sus usos como haptenos para la detección de
Staphylococcus aureus.**

M.-Pilar Marco, Núria Pascual i Carme Pastells

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) 75%
Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales
y Nanomedicina (CIBER-BBN) 25%

Número de sol·licitud: PCT/ES2015/P201530780

Resum:

La novetat inventiva d'aquest treball ens va portar a patentar el treball de la producció dels immunoreactius contra el PG de *S. aureus*, així com el desenvolupament dels anticossos contra el mateix epítol i el desenvolupament d'un immunoassaig de tipus ELISA. Tot aquest treball ha estat posteriorment publicat a la revista *Analytica Chimica Acta* tal com es detalla a l'apartat 3.4.2.



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201530780	
Fecha de recepción:	03 junio 2015, 12:58 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.947	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS	
Número de solicitantes:	2	
País:	ES	
Título:	Compuestos y sus usos como haptenos para la detección S. aureus	
Documentos enviados:	Descripción-1.pdf (40 p.) Reivindicaciones-1.pdf (7 p.) Dibujos-1.pdf (6 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	03 junio 2015, 12:58 (CEST)	
Codificación del envío:	9A:80:AF:12:CF:2F:41:15:88:56:BA:D2:FA:CE:AE:2E:B8:2B:FA:99	



ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.
Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/




(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCIÓN LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS <input type="checkbox"/> España ES Q2818002D C/ SERRANO 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	080,00 %
(5-2) SOLICITANTE 2:	DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL:	CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA EN RED (CIBER) <input type="checkbox"/> España ES G84884477 C/ MONFORTE DE LEMOS 5 MADRID 28 Madrid 28029

APELLIDOS: PONS ARIÑO NOMBRE: ANGEL CÓDIGO DE AGENTE: 0499/5 NÚMERO DE PODER: 20081765	
(16) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN: DESCRIPCIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 40 REIVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 35 DIBUJOS: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 6 RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): ARCHIVO DE PRECONVERSION: <input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 LISTA DE SECUENCIAS PDF: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: <input type="checkbox"/> OTROS (Aparecerán detallados):	
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA: DOC COPIA DNI: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: DOC COPIA OTROS: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:	[]
(18) NOTAS:	
(19) FIRMA:	
FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:	

 MINISTERIO DE INDUSTRIA, ENERGÍA Y TURISMO	 Oficina Española de Patentes y Marcas	TASA en materia de Propiedad Industrial CODIGO 511	Modelo 791
---	--	---	-------------------

Identificación
Ejercicio: 2015 Nro Justificante: 7915110273865
Sujeto Pasivo NIF/CIF: Apellidos y Nombre o Razón Social:
Agente o Representante legal (1): NIF/CIF: 50534279J Apellidos y Nombre o Razón Social: ANGEL PONS ARIÑO Código de Agente o Representante (2): 0499

Autoliquidación
Titular del expediente si es distinto del pagador: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES Modalidad Expediente: P Número Expediente: Tipo (3): Clave: IE01 Año: 2015 Concepto: SOL. DE INVENCION O REAHABILITACIÓN POR INTERNET Unidades: 1 Importe: 63,68

Referencia OEPM: 88112441552 909992100200188112441552

Declarante
Fecha: 3/06/15 12:30 Firma: ANGEL PONS ARIÑO

Ingreso
Importe en euros: 63,68 Adeudo en cuenta: <input checked="" type="checkbox"/>
NRC Asignado: 7915110273865000000001

Modelo 791

(1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
 (2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
 (3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.

3.4.2 PUBLICACIÓ III: ESTRATÈGIA IMMUNOQUÍMICA BASADA EN ELS EPÍTOPS PEPTÍDICS DEL PEPTIDOGLICÀ PER A LA DETERMINACIÓ DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

An Immunochemical Strategy to Determine *Staphylococcus aureus* based on Peptidoglycan Peptide Epitopes.

Carme Pastells, Gerardo Acosta, Núria Pascual, Fernando Albericio, Miriam Royo i M.-Pilar Marco

Analytica Chimica Acta, Volum 889, pàgines 203-211, 2015

Resum:

En aquest treball s'ha desenvolupat un assaig de tipus ELISA competitiu indirecte en microplaca per a la detecció de *S. aureus* de manera ràpida i específica. En primer lloc es van produir anticossos policlonals específics contra el pentapèptid de cinc glicines, un epítot exclusiu de la paret bacteriana de *S. aureus*, i posteriorment es va procedir a la caracterització dels antisèrums i desenvolupament de l'assaig immunoquímic. En tampó l'assaig PSau3-BSA/As291 aconsegueix una detectabilitat per al PSau7 de IC_{50} de $0,72 \pm 0,05$ nM ($8,52 \pm 1,18$ ng mL⁻¹) i un LOD de $0,11 \pm 0,01$ nM ($0,13 \pm 0,01$ ng mL⁻¹).

Per tal de millorar la detectabilitat del mètode es va procedir a l'estudi de tractaments de mostra per alliberar el pèptid diana de la paret bacteriana. El protocol final establert consisteix en el tractament amb TFMSA que permet trencar l'enllaç O-glicosídic de la paret i deixar l'enllaç peptídic intacte. L'efecte matriu que tenia el tractament de deglicosilació va ser minimitzat i finalment es va obtenir un assaig ELISA per poder quantificar les mostres tractades amb TFMSA amb una IC_{50} de $16,05 \pm 1,15$ nM ($19,05 \pm 1,36$ ng mL⁻¹) i LOD de $3,43 \pm 0,23$ nM ($4,20 \pm 0,28$ ng mL⁻¹) pel PSau7.

Com a prova de concepte es va procedir a l'avaluació de mostres de BAL i BAS. L'efecte matriu del BAS i el BAL que podrien mostrar en l'ELISA es veu minimitzat un cop aplicat el tractament de TFMSA. D'aquesta manera, els nivells de detectabilitat establerts en BAL i BAS són molts semblants als obtinguts per al PBST-D. S'obté per al BAL i per al BAS un LOD de $18,92 \pm 1,55$ ng mL⁻¹ ($128,10 \pm 10,75$ nmols Kg⁻¹ de BAL) i $18,92 \pm 1,55$ ng mL⁻¹ ($101,20 \pm 14,93$ nmols Kg⁻¹ de BAS), respectivament.

Per acabar, com a validació de l'especificitat de l'assaig es va avaluar la reactivitat creuada amb altres microorganismes, els quals van donar negatiu tant abans com després d'esser tractats amb el TFMSA.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

An immunochemical strategy based on peptidoglycan synthetic peptide epitopes to diagnose *Staphylococcus aureus* infections



Carme Pastells ^{a, c}, Gerardo Acosta ^{b, c}, Nuria Pascual ^{a, c}, Fernando Albericio ^{b, c, d, e},
Miriam Royo ^{b, c}, M.-Pilar Marco ^{a, c, *}

^a Nanobiotechnology for Diagnostics (Nb4D), IQAC-CSIC, Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^b Combinatorial Chemistry Unit, Barcelona Science Park, Baldri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain

^c Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

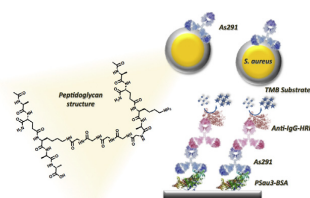
^d Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^e School of Chemistry, University of Kwa-Zulu-Natal, 4001 Durban, South Africa

HIGHLIGHTS

- Antibodies towards a specific *S. aureus* peptidoglycan epitope have been developed.
- The developed ELISA is able to detect *S. aureus* down to 10^4 CFU mL⁻¹ in 2.5 h.
- Deglycosylation of the peptidoglycan increases the limit of detection of the assay.
- The assay is able to detect specifically *S. aureus* in respiratory samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2015

Received in revised form

7 July 2015

Accepted 16 July 2015

Available online 8 August 2015

Keywords:

Staphylococcus aureus

Peptidoglycan

Immunoassay

Diagnostic

Trifluoromethanesulfonic acid

Antibodies

ABSTRACT

The characteristic pentaglycyl cross-bridge of the *Staphylococcus aureus* peptidoglycan (PG) cell wall component is an attractive epitope to raise specific antibodies against this microorganism. Based on this approach, we report here for the first time a competitive ELISA able to detect *S. aureus* down to 10^4 CFU mL⁻¹, without pre-enrichment on cell culture. The antibodies were raised against peptide-protein bioconjugates prepared by covalently coupling peptide haptens (PSau6 and PSau8) designed and synthesized taking into consideration the complex tridimensional structure in the PG polymer. Deglycosylation of the PG under acidic conditions has found to increase assay detectability. Assay performance has been evaluated in clinical samples such as bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchoalveolar endotracheal aspirates (BAS) showing promising results for further implementation of this immunoassay as a daily routine diagnostic tool. Cross-reactivity studies have demonstrated that the immunoassay is specific for *S. aureus*.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is commonly found on the skin and in the nose of about 30% of the individuals without causing any harm in most of the cases. However, eventually *S. aureus* may cause

* Corresponding author. Department of Chemical and Biomolecular Nanotechnology, IQAC-CSIC, Jordi Girona, 18-26, 08034-Barcelona, Spain.

E-mail address: pilar.marco@cid.csic.es (M.-P. Marco).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.049>

0003-2670/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

infections leading to pneumonia (patients underlying other lung diseases), endocarditis (infection of the heart valves), osteomyelitis or even sepsis. At the health care settings, the risk for a more serious infection is higher because patients often have a weakened immune system, have undergone procedures involving surgery or use of intravenous catheters. *S. aureus* is the second most frequently isolated microorganism, after *Escherichia coli*, in health care associated infections (HAI) in acute care hospitals in the EU. Moreover, there is the risk of antibiotic resistance strains, being the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), one of the most important global concerns regarding these infections [1–5].

Fast and accurate diagnostic, identifying the pathogen causing the infection, is crucial for an appropriate treatment of the patient and its survival, particularly when the infection passes at the blood stream in which case, the fatality rate increases significantly. The actual methods used in microbiological laboratories are still mainly based on culture plates [4]. Unfortunately, these methods require enrichment steps on specific media to reach the necessary detectability. This causes an unaffordable delay until the time when the results are provided to the doctor in order to start treatment. Many efforts are being invested to develop more efficient techniques to diagnose infections, including PCR approaches or serological methods. Quantitative real-time PCR (qPCR) reaches very good concordances with the culture (100% sensitivity and 92–99% selectivity) significantly decreasing the analysis time [6,7]; however, requires expensive equipment, highly trained personnel and extensive validation for clinical interpretation of the results on routine clinical analyses. Serological assays have been used to diagnose endocarditis [8,9], to distinguish between deep or superficial infections [10], or to identify the organ infected, by analyzing the IgG profile against several *S. aureus* antigens [11]; but, the specificity of these assays in respect to other microorganisms is low [12], and do not provide sufficient detectability to diagnose the disease at early stages. However, these serological studies have consistently pointed at the high antigenicity of wall components such as the peptidoglycan (PG) and the teichoic acid (TA) [13–15]. At the light of these evidences, several authors have attempted to set-up immunochemical assays by raising antibodies against UV inactivated bacteria [16,17] or peptidoglycan fragments [18–21].

The PG (also known as murein sacculus) is a complex non crystalline macromolecule whose three-dimensional structure is difficult to determine, although worth NMR [22], HPLC-MS [23,24], biochemical and electron microscopy experiments [25] have provided interesting insights about this heterogeneous biomolecule [26,27]. In general, PG consists of repeating disaccharides units, N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetyl-muramic acid (MurNAc) cross-linked by peptide chains alternating D- and L-aminoacids. Regarding glycan strands, *S. aureus* has a short average chain length of about 18 disaccharides units (compared with some other species that can have a chain length up to 250 disaccharides [28] and the peptide units are highly cross-linked (up to 70% [22,29]). *S. aureus* PG presents a pentapeptide stem [Ala-DGlu(&1)-NH₂](α 1)-Lys-DAla-DAla] cross linked by a pentaglycyl bridge (Gly)₅ that links the ϵ -NH₂ group of the Llys on the third position of one stem to the carbonyl group of DAla on the fourth position of another stem peptide (see PSau5 and PSau7 in Fig. 1). This pentaglycyl bridge is quite unique for *S. aureus*, although certain strains, such as for example the wild type MRSA present *fem* factor mutations that lead to a certain proportion of co-existing triglycyl (FemB) and monoglycyl (FemA) [29–31] bridges. Other gram-positive bacteria contain dipeptides, a single aminoacid residue, or even no bridge [32].

Some authors in the past have addressed production of antibodies against *S. aureus* particular PG peptide sequences such as the Lys-DAla-DAla epitope [18] but this sequence is also present in

other bacteria such as *Enterococcus lactobacillus* or *Streptococcus pneumoniae*. In contrast, the (Gly)₅ bridge constitutes a very specific epitope of *S. aureus*. In fact, it has been reported the presence of anti(Gly)₅ antibodies in the serum of patients infected with *S. aureus* [33], indicating that it could be a good antigenic moiety. Previous attempts to produce antibodies against this particular specific moiety did not succeed on subsequently establishing improved reliable immunochemical diagnostic methods. Our hypothesis lies on the lack of an appropriate hapten design for this purpose. Thus, Wergeland et al. [19] raised monoclonal antibodies just using the oligopeptide (Gly)₅ in its free form, but because of its low immunogenicity, the antibodies produced were IgM which are much less robust and stable than IgG. Seidl and Schleifer [34] coupled the pentaglycan peptide to human serum albumin (HSA) to enhance the immune response, but the peptide sequence was still too small. More recently, Sandhu et al. [21] reported the preparation of antibodies against a semi-synthetic peptidoglycan precursor containing the stem peptide and the pentaglycine chain, but also the N-acetylmuramic acid, which is present in most of the PGs from either gram positive and gram negative bacteria. Although the authors show recognition of the *S. aureus* cell wall preparations do not go further into the potential use of these antibodies as diagnostic tools. As one step forward we report here the development of specific antibodies for *S. aureus*, using synthetic peptide haptens mimicking the PG peptide monomers containing the characteristic (Gly)₅ bridge avoiding the sugar moieties present in other bacteria. Based on the recognition of such epitope, we report for the first time a competitive microplate-based ELISA able to detect specifically *S. aureus* in clinical samples.

2. Materials and methods

2.1. Buffers

PBS is 10 mM phosphate buffer on a 140 mM NaCl solution, and the pH is 7.5. PBST is PBS with 0.05% Tween 20. PBT is PBST without NaCl. PBST-D is a blank aqueous phase extraction solution resulting from the chemical deglycosylation treatment, performed as described below, diluted 1/3.6 with PBT. Coating buffer is 50 mM carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6. Citrate buffer is a 40 mM solution of sodium citrate pH 5.5. The substrate solution contains 0.01% TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and 0.004% H₂O₂ in citrate buffer. Borate buffer is 0.2 M boric acid/sodium borate pH 8.7.

2.2. Reagents and immunoreagents

The peptides PSau3, PSau4, PSau5, PSau6, PSau7 and PSau8 were synthesized according to the scheme shown in Fig. S1 and as described in the Experimental Section of the Supplemental Material (SM) document. The peptidoglycan from *S. aureus* (77140) and the anti-rabbit IgG-Peroxidase (A8275) were purchased from Sigma–Aldrich (San Luis, Estados Unidos). *S. aureus* CECT 5190, *E. coli* K12 CECT 433 and *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110 were supplied by the Protein Production Platform (PPP, Applied Microbiology group, Autonomous University of Barcelona, Spain) previously inactivated by heat at 100 °C. The samples were suspended in PBS and stored at –40 °C.

2.3. Synthesis of the bioconjugates

Peptide-protein bioconjugates of haptens with a Cys residue were synthesized using N-succinimidyl-3-maleimidyl propanoate (N-SMP) or N-succinimidyl iodoacetate (N-SIA), as heterobifunctional cross-linkers, to obtain the corresponding peptide-

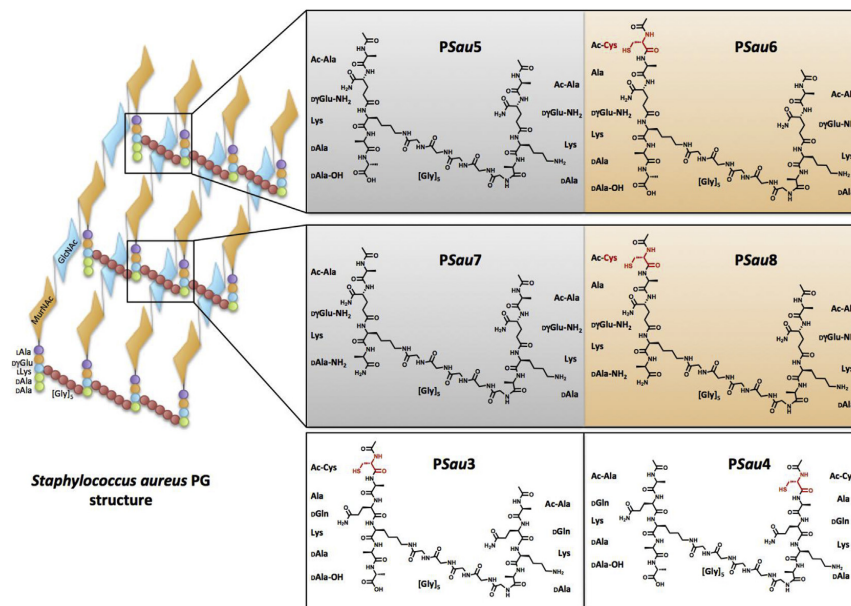


Fig. 1. *Staphylococcus aureus* peptidoglycan structure showing the peptide epitopes selected (PSau5 and PSau7, grey shadow) and their respectively immunogen haptens (PSau6 and PSau8, orange shadow). Peptides at the bottom box are the heterologous competitor haptens used for competitive ELISA development. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

maleimidopropyl (peptide-MPCO-) or peptide-acetyl (peptide-CH₂CO-) protein conjugates. PSau6 and PSau8 were coupled to HCH (horseshoe crab hemocyanin) and BSA (bovine serum albumin) while PSau3 and PSau4 were only coupled to BSA. The bioconjugation was performed through a two-step procedure.

2.3.1. Step 1: activation of the proteins

A solution of N-SMP (1.6 μ mol, 0.43 mg) or N-SIA (9.22 μ mol, 2.61 mg) in dry DMF (200 μ L) was added dropwise to a solution of the protein (HCH or BSA, 10 mg each) in borate buffer (1.8 mL). The mixture was stirred 4 h at room temperature (RT) and then purified by size-exclusion chromatography using borate buffer as eluent. The eluted fractions (0.5 mL) of the corresponding MPCO- or ICH₂CO-protein conjugates were collected in Eppendorf tubes, and those testing positive in the Bradford protein test were combined (3 mL) [35]. A part of this solution was reserved for MALDI-TOF-MS analysis, and the rest was used for step 2.

2.3.2. Step 2: bioconjugation

Cys-PSau3 (2.17 mg, 1.6 μ mol), PSau4 (2.17 mg, 1.6 μ mol), PSau6 (6.26 mg, 4.6 μ mol) and PSau8 (5.93 mg, 4.6 μ mol) haptens were dissolved in 1:1 ACN:MilliQ H₂O (200 μ L) and added dropwise to the corresponding purified activated protein solutions (10 mg; see step 1). Cys-PSau3 and Cys-PSau4 were conjugated to the MPCO-protein and Cys-PSau6 and Cys-PSau8 were conjugated to the ICH₂CO-protein. The mixture was kept under slight stirring for 4 h at RT to obtain the corresponding PSau3- and PSau4-MPCO-protein or PSau6- and PSau8-CH₂CO-protein conjugates. For the PSau6- and PSau8-CH₂CO-protein conjugates, capping of the remained unreacted iodine was performed by adding a solution of cysteine (80 mM, 200 μ L) and stirring the mixture for 2 h more at RT. Finally, the conjugates were purified by dialysis against 0.5 mM PBS

(4 \times 5 L) and MilliQ water (1 \times 5 L), lyophilized and stored at -80 $^{\circ}$ C. Working aliquots were prepared at 1 mg mL⁻¹ in PBS and kept at 4 $^{\circ}$ C.

2.4. Hapten density analysis

The hapten densities of the BSA conjugates were calculated by MALDI-TOF/TOF-MS by comparing the molecular weight of the native protein with the corresponding MPCO- or ICH₂CO-proteins and with the peptide-MPCO or -CH₂CO-protein conjugates. MALDI spectra were obtained by mixing the matrix, trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (2 μ L, 10 mg mL⁻¹ in CH₃CN:H₂O 70:30, 0.1% formic acid, freshly prepared) with the solutions of the bioconjugates or the proteins (2 μ L, 10 mg mL⁻¹ in CH₃CN/H₂O 70:30, 0.1% TFA) (see Table S1).

2.5. Polyclonal antibodies

The antisera have been developed making use of the ICTS "NANBIOSIS", specifically the Custom Antibody Service (Cabs) Unit of the CIBER in Bioengineering, Biomaterials & Nanomedicine (CIBER-BBN at the IQAC-CSIC). For this purpose, four female New Zealand white rabbits weighting 1–2 Kg were immunized according to the immunization protocol previously reported [36]. The antisera obtained from the immunization with PSau6-CH₂CO-HCH were labeled as As288 and As289 and those with PSau8-CH₂CO-HCH as As290 and As291. Evolution of the antibody titer was assessed by measuring the binding of serial dilutions of the antisera to microtiter plates coated with homologous conjugates (PSau6-CH₂CO-BSA and PSau8-CH₂CO-BSA). After an acceptable antibody titer was observed, the rabbits were exsanguinated and the blood was collected in vacutainer tubes provided with a serum

separation gel. Antiserum was obtained by centrifugation 15 min at 4000 rpm and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the presence of 0.02% NaN_3 . Working aliquots were stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6. Immunochemical assays

The appropriate concentrations of the antisera (As288–As291) and the bioconjugates (PSau3-MPCO-BSA, PSau4-MPCO-BSA, PSau6- CH_2CO -BSA or PSau8- CH_2CO -BSA) used to establish the competitive ELISAs were selected after a 2D checkerboard titration assay performed as described [36]. With the best As/bioconjugate combination, the following quantitative immunochemical procedures were established.

2.6.1. ELISA

Microtiter plates were coated with PSau3-MPCO-BSA ($0.125\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in coating buffer, $100\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$) 4 h at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, the plates were washed with PBST ($4 \times 300\text{ }\mu\text{L}$) and solutions of the peptide (PSau5 or PSau7, from 1500 nM to 0 nM in PBT) or PG (from $200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ to $0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in PBT) standards or the samples (bacterial suspensions in PBS), previously preincubated with the antiserum (As291, $1/6000$ diluted in PBT) in equal volumes for 30 min at RT, were added ($100\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$). After 30 min at RT, the plates were washed as before and the anti-IgG-HRP solution ($1/6000$ in PBST, $100\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$) was added and incubated for 30 min more. After another cycle of washes, the substrate solution was added ($100\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$), and the enzymatic reaction was stopped after 30 min at RT with $4\text{ N H}_2\text{SO}_4$ ($50\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$). The absorbances were measured at 450 nm .

2.6.2. D-ELISA

Deglycosylated samples (see below) were measured on microplates coated with PSau3-MPCO-BSA ($1.5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in coating buffer, $100\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$). Prior the addition to the microplates, the samples or the PSau7 standard solutions (from 3350 nM to 0 nM in PBST-D, $90\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$), were preincubated with the antibody (As291, $1/500$ diluted in PBT, $10\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$) for 30 min at RT.

2.7. Samples

BAL or BAS samples testing negative for *S. aureus* were collected from non infected patients and used as negative controls. Pooled samples were prepared by mixing equal volumes of samples from ten different patients. A solution of DTT ($200\text{ }\mu\text{L}$, 0.1% w/v in water) was added to the BAL or BAS samples (50 mg) and stirred for 30 min at RT. Afterwards, PBS ($200\text{ }\mu\text{L}$) was added and the solution passed through a $48\text{ }\mu\text{m}$ nylon gauze filter and centrifuged (10 min, 4000 G). The supernatant collected was aliquoted and stored at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.8. Sample deglycosylation

PG from commercial preparations or from bacterial suspensions was deglycosylated with trifluoromethane sulfonic acid (TFMSA). PG (1 mg), PSau7 (1 mg) or bacterial samples (*S. aureus*, *E. Coli* and *P. aeruginosa*; 1 mL of 10^9 CFU mL^{-1} lyophilized bacteria) were suspended in a 2:1 solution of TFMSA:anisole (0.5 mL) and stirred for 1 h at RT. Diethyl ether (1.5 mL) was subsequently added to the suspension and further, the mixture was added dropwise to a 1:1 solution of pyridine:Milli-Q water (2.5 mL). The aqueous phase was washed with diethyl ether ($2.5\text{ mL} \times 3$) and dried using nitrogen flow during 10 min.

3. Results and discussion

A sensitive and robust competitive immunochemical assay for *S. aureus* detection, based on the use of antibodies against particular peptide epitopes of its PG, has been developed. Previous studies addressed to elucidate the chemical structure of the *S. aureus* PG [22,37] showed that the stem peptide can be double cross-linked with two pentaglycyl cross-bridges as it is shown in Fig. 1. During its biosynthesis a short peptide of five amino acid residues (stem peptide, [Ala-DGlu(&1)-NH₂][(&1)-Lys-DAla-DAla]) is attached to the MurNAc residue and further cross-linked to the next one by another peptide consisting of five glycine residues, a peptide bridge very specific of *S. aureus* PG. When the cross-links are formed, the terminal DAla residue is cleaved off by a transpeptidase so that the final structure has only a single DAla [38]. However, the peptidoglycan seems not to be uniform, mixing stem peptides conserving the DAla–DAla terminus with some others that have only one DAla terminus.

3.1. Hapten design and synthesis

According to this knowledge, two representative peptide epitopes were selected (see PSau5 and PSau7 structures in Fig. 1). PSau5 correspond to those PG peptide moieties in which the stem peptides are not double cross-linked and therefore, the DAla–DAla sequence remains, and PSau7 represent the peptide PG moieties constituted by stem peptides completely cross-linked and therefore with only a DAla residue.

Immunizing haptens PSau6 and PSau8 were designed to mimic and maximize recognition of these epitopes (see structures in Fig. 1) keeping almost the same chemical structure of the target epitopes (PSau5 and PSau7, respectively), except for the additional Cys residues introduced during the peptide synthesis for further preparation of the bioconjugates. In contrast, for the competitor haptens (PSau3 and PSau4), chemical heterology (the chemical structures of the competitor and the immunogen haptens are different) was introduced since it has been reported that it may increase assay detectability [39] (see chemical structures in Fig. 1). Hence, PSau3 contains a DGI_n residue instead of the D γ Glu-NH₂ of the PG structure and the PSau6. The DGI_n forms a normal amide bond with the neighbor amino acid through the α -COOH group, unlike D γ Glu-NH₂ of the *S. aureus* PG (also in PSau6 and PSau5) which is linked through the γ -COOH group. PSau4 also possess this modification, but additionally the Cys residue is placed on the opposite side, on the second stem peptide, living the DAla–DAla terminus more accessible for antibody recognition.

The six peptides were synthesized as described in the SM document (see Fig. S1) with the carboxy and the amino terminal residues amidated ($-\text{CONH}_2$ and $\text{CH}_3\text{CONH}-$, respectively) to mimic the link to the sugars or the amide bond that links each peptide to the next pentaglycyl bridge. Only in the case where there were two DAla aminoacids (PSau3, PSau4, PSau5 and PSau6), the carboxy terminal of the last Ala residue was left free, since this is how probably remains in the PG structure.

3.2. Immunoreagents: synthesis of PSau peptide bioconjugates and antibody production

Haptens were conjugated through a $\text{S}_{\text{N}}2$ reaction between the SH of the Cys residues and the corresponding electrophilic groups of the iodoacetylated and maleimido activated proteins (ICH_2CO – and MPCO–protein). Immunizing haptens, PSau6 and PSau8 were coupled to HCH and BSA, and PSau3 and PSau4 were coupled to BSA, rendering bioconjugates with appropriate hapten densities according to MALDI-TOF/TOF-MS (see Table S1). In this manner, we

obtained a collection of four peptide-protein bioconjugate competitors with different degrees of heterology (PSau4-MPCO-BSA > PSau3-MPCO-BSA > PSau6-CH₂CO-BSA > PSau8-CH₂CO-BSA) in respect to the target epitopes. The resulting peptide-CH₂CO-HCH bioconjugates were used to raise antibodies by immunizing New Zealand White rabbits. Antisera against PSau6-CH₂CO-HCH were labeled As288 and As289, and those against PSau8-CH₂CO-HCH as As290 and As291.

3.3. *S. aureus* ELISA development and evaluation

On a first instance, the avidity of the antisera raised against PSau6- and PSau8-CH₂CO-HCH for the different bioconjugates was tested in titration experiments. As expected, all the antisera showed greater avidity for the homologous conjugates, but when assessing recognition of the *S. aureus* PG under competitive conditions, all bioconjugate competitors rendered assays with comparable features (sixteen assays with similar detectabilities, see Table S2). Thus, competitor hapten heterology did not play a significant role in this assay. Moreover, both, PSau6 and PSau8 immunizing haptens also provided immunoassays with similar parameters, indicating that both peptide epitopes are equally accessible for antibody recognition in the PG.

The As291/PSau3-MPCO-BSA antisera/bioconjugate combination was selected for further studies. Aiming to evaluate the effect of physico-chemical parameters on the assay and improving the detectability for the *S. aureus* cell wall, the pH (5.5–9.5) and ionic strength (1.5–52.2 mS cm⁻¹) of the assay buffer as other parameters such as the length of the competitive step (10–60 min) or the introduction of a preincubation phase (0–60 min) of the target with the antisera, were evaluated. It was found that the assay is stable between pH values of 5.5 and 8.5 and that low ionic strength improved the assay detectability (see Fig. S2, graphs A and B). Moreover, the introduction of a preincubation phase and incrementing the length of the competitive step improved assay performance (Fig. S2, graphs C and D). Hence, a 15 min preincubation followed by 30 min competitive step was established, using an assay buffer with an ionic strength of 1.5 mS cm⁻¹. Under these conditions, the ELISA was able to reach a LOD (limit of detection) of 120 ± 90 ng mL⁻¹ (z 3 ng well⁻¹; N = 2 days) and an IC₅₀ of 1002 ± 920 ng mL⁻¹ (N = 2 days) for PG (see Fig. 2A, Table 1) with a total assay time of 2.5 h, using only 25 µL of sample. These features improved previously reported assays developed using antibodies against different PG epitopes, demonstrating the superiority of the hapten design followed in this approach. Thus, the latex agglutination assay reported by Seidl and Schleifer [34] showed a LOD of 10 ng but using 1 mL of sample (11 mL total assay volume) and after

14 h of incubation (2 h at 56 °C), and the sandwich ELISA developed by Wergeland et al. [19] reached a LOD of 200 ng mL⁻¹ after a total assay time of about 21 h. More recently, Sandhu et al. [21] have reported a 4 h ELISA based on the detection of PG previously adsorbed on the well plates reaching a LOD value which is two orders of magnitude higher than the assay described here.

At this point, we decided to use the PSau5 or PSau7 peptides as reference standard for quantification of the immunoreactivity of the samples, instead of using the PG. This was due to the lack of standardization of the commercial PG preparations, which are different depending on the procedure used for their extraction from the cell wall. In contrast, the PSau7 (or PSau5) peptides are well-defined and characterized pure chemical substances, which would provide more reproducible results conferring better reliability to the assay.

As it can be observed in Fig. 2B (blue and black curves, solid symbols) and Table 1, both PSau5 and PSau7 peptide epitopes were recognized in a similar extent (LOD 0.11 ± 0.01 and 0.10 ± 0.01 ng mL⁻¹, respectively, N = 3 days), even though the As291 was raised against the PSau8 hapten, possessing just one Ala residue. This is not strange considering that the competitor hapten of this ELISA, PSau3, has a high degree of heterology in respect to the immunizing hapten, which favors effective competition of substances with similar chemical features. Homologous assays (chemical structures of the immunizing and competitor hapten are the same) usually render much more specific assays [40].

Since recognition of both epitopes was similar on subsequent studies PSau7 was used to calibrate the assay, expressing the results as PSau7 immunoreactivity equivalents (PSau7 IR equiv.). Moreover, in this way, the different PG batches could be characterized in terms of their immunochemical response in the assay as PSau7 IR equivs.

Examining the capability of the As291/PSau3-MPCO-BSA assay to detect *S. aureus*, by measuring serial dilutions of bacterial suspensions prepared in PBS, we realize that only preparations with cell densities over 10⁷ CFU mL⁻¹ could be effectively detected. Although this LOD is close to other reported assays addressed to immunochemically determine *S. aureus* [17,41], we considered this detectability insufficient for diagnostic purposes [17,42] since we aimed at developing an immunochemical diagnostic tool able to detect *S. aureus* infections without the need of pre-enrichment steps. Our hypothesis for this lack of detectability was based on the hindrance of the PG polymer inside the cell wall to allow effective antibody interactions with the selected epitopes.

3.4. Deglycosylation of the PG

Breaking the cell wall or deglycosylating the PG, to make the

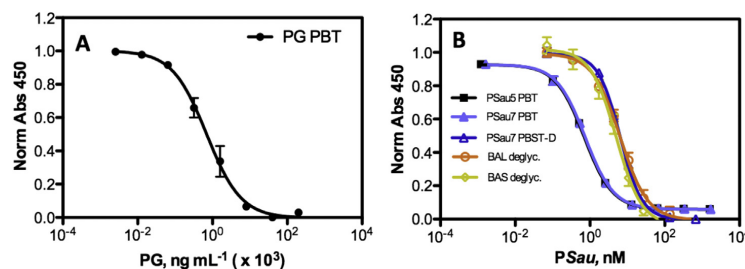


Fig. 2. Normalized calibration curves of the As291/PSau3-BSA ELISA. **Graph A:** Calibration curve obtained with the commercial PG preparation in PBT. **Graph B:** Calibration curves obtained using the peptide epitopes PSau5 and PSau7 as reference standard in PBT. The graph also shows the calibration curve of PSau7 in PBST-D (assay buffer used to analyze deglycosylated samples) and in BAL and BAS samples. The data shown in the graphs correspond to the average of assays run on two or three different days, using three-well replicates each day. The parameters are specified in the Table 1.

Table 1
Parameters of the microplate-based ELISA developed, using distinct analytes (PSau5, PSau7 and PG) and different conditions (PBT and PBST-D).

Analyte-	PSau5	PSau7				PG ^a
Assay conditions-	PBT ^b	PBT ^c	PBST-D ^c	BAL Deglyc. ^{c,d}	BAS Deglyc. ^{c,d}	PBT ^b
Amaz	0.926 ± 0.010	0.911 ± 0.044	1.609 ± 0.039	1.696 ± 0.043	1.612 ± 0.061	0.752 ± 0.020
Amin	0.059 ± 0.006	0.061 ± 0.003	0.089 ± 0.044	0.166 ± 0.042	0.152 ± 0.056	0.078 ± 0.019
Slope	-1.14 ± 0.06	-1.07 ± 0.07	-1.26 ± 0.09	-1.17 ± 0.14	-1.27 ± 0.22	-1.15 ± 0.13
IC ₅₀ , ng mL ⁻¹	0.86 ± 0.03	0.82 ± 0.06	7.62 ± 0.54	18.92 ± 1.55	14.98 ± 2.20	1002 ± 920
nM or nmols Kg ⁻¹	0.69 ± 0.02 ^e	0.65 ± 0.05 ^e	6.42 ± 0.46 ^e	128.10 ± 10.75 ^f	101.20 ± 14.93 ^f	–
LOD, ng mL ⁻¹	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	1.68 ± 0.11	1.13 ± 0.43	1.11 ± 0.22	120 ± 90
nM or nmols Kg ⁻¹	0.10 ± 0.01 ^e	0.09 ± 0.01 ^e	1.37 ± 0.09 ^e	19.08 ± 7.35 ^f	18.8 ± 3.7 ^f	–
R ²	0.998 ± 0.001	0.999 ± 0.001	0.931 ± 0.154	0.958 ± 0.126	0.878 ± 0.219	0.995 ± 0.004

^a PG molecular weight is unknown. Assays were run using three-well replicates under the conditions shown in the table. PBT indicates that the immunoassay protocol used was for non-deglycosylated samples, while PBST-D indicates that, the assay were run using the conditions for the deglycosylated samples.

^b The data shown is the average and standard deviation of the fitting parameters of calibration curves run in 2 different days.

^c The data shown is the average and standard deviation of the fitting parameters of calibration curves run in 3 different days.

^d A multiplying factor of 2.5 resulting from the deglycosylation treatment has been applied in the IC₅₀ and LOD values.

^e Values are expressed in nM.

^f Values are expressed in nmols of PSau7 Kg⁻¹ BAL.

^g Values are expressed in nmols of PSau7 Kg⁻¹ BAS.

peptide epitopes more accessible to the antibody, were contemplated as potential strategies to increase assay detectability. Bacterial cell wall cleavage methods have been broadly studied to elucidate PG structure or even to develop new antimicrobial agents. Include either chemical [43,44] or enzymatic methods [45–47], a combination of both or even physical methods [48–51].

Enzymatic methods are extremely restrictive due to the specificity of the active binding site; therefore, mutations in the bacterial cell wall inactivate their activity. In particular, *S. aureus* presents resistivity to lysozyme [52,53] due to the O-acetylation of the hydroxyl at C6 of the MurNAc. The endopeptidase lysostaphin, although it has been reported to be one of the most efficient enzymes to hydrolyze the *Staphylococcus* cell wall, was not an option in this case, since its selectivity is addressed towards the specific pentaglycine peptide bridge, and we needed to preserve this specific moiety for antibody recognition (see Fig. S4). N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases could had been a reasonable alternative with its bacteriolytic activity cleaving the linkage between the polysaccharide and the peptide subunits [37,54,55] but we were not able to acquire them from commercial sources. Under this scenario, we opted for the chemical hydrolysis using trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA) [43,44,56]. TFMSA is non-dependent of the mutations, leaves the peptide chains unaffected and removes the O- or N-linked glycans.

Therefore, removal of the polysaccharide units was achieved by chemical hydrolysis treating the samples TFMSA. Recovery studies indicated that the peptide epitopes were not affected by the treatment, since the PSau7 IR equiv. measured before and after the treatment were very similar and the recoveries were greater than 85% in all cases (see Table S2). Moreover, deglycosylation increased the availability of the peptide epitopes for antibody recognition allowing to increase the assay detectability for PG and therefore of *S. aureus* (see below).

3.5. ELISA for deglycosylated samples (D-ELISA)

Considering that the TFMSA treatment could alter not only the PG, but also the physico-chemical features of the resulting sample, we assessed the potential nonspecific interferences caused by this treatment in the As291/PSau3-MPCO-BSA ELISA. For this purpose, we run the deglycosylation procedure, as it is described in the experimental section, but in the absence of sample, and used the final solution to prepare standard curves. As it can be observed in Fig. S3, graph A, the signal was almost completely inhibited in this

media. The extract had to be diluted at least 80 times in order to remove the nonspecific interferences caused by this treatment (see Fig. S3, graph B), which it would decrease substantially the detectability of the assay. Therefore, we opted for re-adjusting the conditions running 2D checkerboard experiments using the TFMSA extract diluted 1/4 in PBT (pH of 5.5 and a conductivity of 28 mS cm⁻¹). Fig. 2B (open triangles, blue) shows the calibration curve recorded under these conditions and Table 1 (column entitled PBST-D) shows the parameters extracted from the adjustment of the calibration curve to a four-parameter equation.

As it can be observed, under these new conditions, the LOD achieved for PSau7, used as reference, was slightly worse, 1.37 ± 0.09 nM (N = 3 days), however, our hope was to find out that this treatment will increase the availability for recognition of the target peptide epitopes. To probe this hypothesis, samples of commercial PG preparations and from various bacterial suspensions (*S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. Coli*, from 10⁸ to 10⁴ CFU mL⁻¹) were deglycosylated following the procedure described before and after the treatment. As it is shown in Fig. 3A, the treatment increased significantly the immunochemical signal produced by the commercial PG preparation. Similarly, a significant increase was observed for the *S. aureus* culture samples (see Fig. 4, light blue vs dark blue bars), which indicates that the deglycosylation procedure efficiently increments the release of peptide epitopes that react with the antibodies. Hence, after deglycosylation it was possible to detect *S. aureus* cell suspensions down to 10⁴ CFU mL⁻¹ (t-Test $\alpha < 0.05$ ($\alpha = 0.04$) in respect to cell suspensions at 0 CFU mL⁻¹) without pre-enrichment of the cell culture (see Fig. 4, dark blue bars vs light blue bars). Moreover, the assay was very reproducible with coefficient of variations (%CV) of 7.1% and 6.7% at the IC₅₀ and LOD values, respectively (N = 3 days).

Finally, the specificity of the D-ELISA was evaluated by deglycosylating samples of *E. coli* and *P. aeruginosa* and analyze them by ELISA. The preparation of these cell suspensions produced zero or very low response in the assay at concentrations up to 10⁸ and 10⁷ CFU mL⁻¹ (Fig. 3B) demonstrating the specificity of the immunochemical protocol here presented.

3.6. Analysis of clinical samples by D-ELISA

The incidence and significance of *S. aureus* in respiratory airways prompted us to evaluate the functionality of the D-ELISA in BAL and BAS samples. For this purpose, pooled BAL and BAS from control

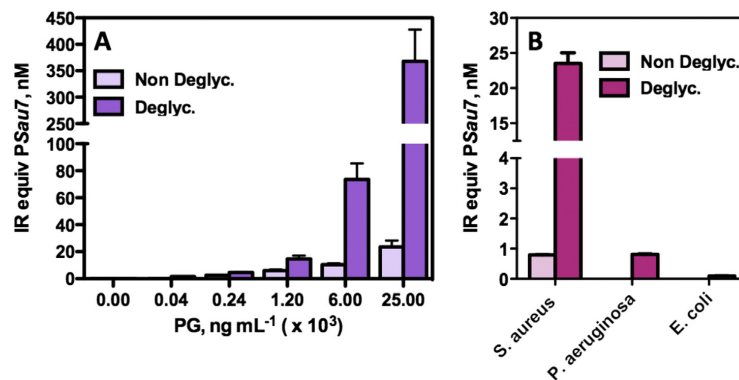


Fig. 3. PSau7 IR equiv recorded for different samples before and after the deglycosylation treatment. **Graph A:** Commercial PG prepared at distinct concentrations. **Graph B:** Immunochemical response of *S. aureus* CECT 5190 versus *P. aeruginosa* CECT 110 and *E. coli* K12 CECT 433. All the suspensions were prepared at 10^7 CFU mL⁻¹. Results are the average of data obtained on assays run in two different days, using three-well replicates for each sample on every assay.

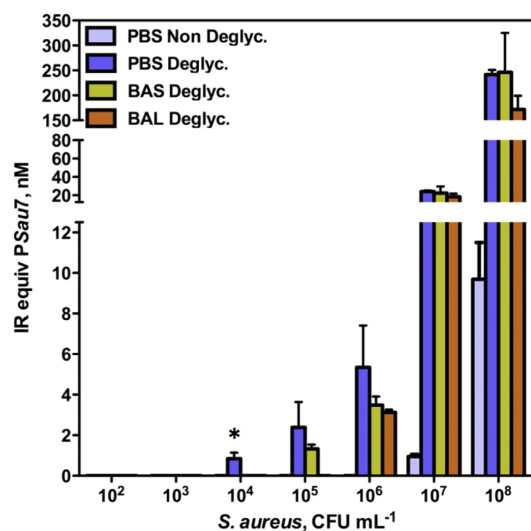


Fig. 4. PSau7 IR equiv recorded from samples of *S. aureus* 5190 spiked at different cell densities in PBS, BAL and BAS. *Indicates the LOD of the deglycosylated samples spiked in PBS. Results are the average of data obtained on assays run in two different days, using three-well replicates for each sample on every assay.

samples, obtained from non infected patients, were spiked with PSau7 treated with DTT, deglycosylated as described above, and measured by the D-ELISA. As it is shown in Fig. 2B, the D-ELISAs run in these clinical samples showed a similar response to that of PBST-D, indicating that it is possible to use the assay to directly measure the PSau7 epitope. This peptide specific moiety of *S. aureus* PG could be detected in BAL and BAS samples with a LOD of 19.08 ± 7.35 ($N = 3$ days) and 18.8 ± 3.70 nmol kg⁻¹ ($N = 3$ days), respectively.

With these promising results, we proceed with the preparation of BAL and BAS samples spiked with *S. aureus* at different concentrations and treated as described before the ELISA measurement. As it can be observed in Fig. 4, the immunochemical response of the

BAL and BAS samples was very similar to that of the PBST-D *S. aureus* spiked samples, although the LOD accomplished was lower (10^5 BAS and 10^6 for BAL), but still useful for diagnostics, considering that the reported ELISA does not need previous pre-enrichment cell culture steps to reach this detectability. Thus, in cystic fibrosis (CF), bronchitis and pneumonia patients bacterial loads around to 10^9 CFU mL⁻¹ have often been reported. Corne et al. [57] reported $>10^4$ CFU mL⁻¹ of *S. aureus* from cultures of BAL and $>10^7$ CFU mL⁻¹ from cultures of BAS from patients suffering pneumonia. In CF patients, *S. aureus* is one of the earliest pathogens to colonize the respiratory airways and bacterial loads up to 10^8 CFU mL⁻¹ in sputum have been reported [58]. Even after vancomycin treatment bacterial loads greater than 10^5 CFU mL⁻¹ have found to still persist for all strains of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) infections [59].

4. Conclusions

This paper reports for the first time the establishment of a competitive ELISA, using antibodies elicited against *S. aureus* PG, able to detect this microorganism down to 10^4 CFU mL⁻¹, without pre-enrichment on cell culture. Previous papers that addressed development of antibodies against the *S. aureus* PG do not show sufficient results to demonstrate the possibility to directly detect bacteria in clinical samples, and often only show data related to the detectability of the PG or cell-wall preparations. In that respect, the strategy used in this paper to raise antibodies against specific synthetic epitopes of the PG has allowed setting up an immunochemical assay with a better detectability and higher sample throughput capabilities, reducing significantly the assay time and the sample volume needed. But the most important contribution of this work is that we demonstrate that with the ELISA here reported not only PG is detected, but *S. aureus* can be directly detected (without pre-enrichment cell culture) in clinical samples at cell densities, which could be useful for the diagnostic in just about 2.5 h (1 h for sample treatment and 1.5 h for the assay). Moreover, the assay is easy to perform, has high-throughput capabilities, allowing running simultaneously many samples, and needs very small sample volumes. Further investigation of improved deglycosylation procedures, or the combination of this chemical method with a selective enzymatic method (i.e. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases) could improve the assay detectability, making

possible to detect *S. aureus* infections at earlier steps. The assay is robust and it shows a good day-to-day reproducibility. Moreover, the immunochemical tool here presented can be very useful to characterize different PG extraction procedures, distinct PG batches or various *S. aureus* strains in terms of their PSau7 or PSau5 IR equiv., as specific important epitopes of the cell wall of this bacterium. This assay has also been applied to BAL and BAS samples and could easily be implemented in a handheld diagnostic device and established as a daily routine infectious disease test.

Dedication

This paper is dedicated to the memory of Francisco Sánchez Baeza.

Acknowledgments

This research has been funded by the CIBER-BBN through the project MICROPLEX and by the MICINN, through the project NanoMeDiag (MICINN, EUI2008-00175). The Nb4D group (formerly Applied Molecular Receptors group, AMRg) is a consolidated research group (Grup de Recerca) of the Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (expedient: 2014 SGR 1484). CIBER-BBN is an initiative funded by the Spanish National Plan for Scientific and Technical Research and Innovation 2013–2016, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions are financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Fund. We acknowledge Prof. Antonio Villaverde, Dr. Èscar Rodríguez and Dr. Elena García for the helpful discussions regarding selection of the targets and their assistance on the preparation of the bacterial suspensions. Carme Pastells has an FI fellowship from the AGAUR (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca) of the Government of Catalonia (Generalitat de Catalunya).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.049>.

References

- [1] L.G. Miller, F. Perdreau-Remington, A.S. Bayer, B. Diep, N. Tan, K. Bharadwa, J. Tsui, J. Perlrath, A. Shay, G. Tagudar, U. Ibebuogu, B. Spellberg, Clinical and epidemiologic characteristics cannot distinguish community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection from methicillin-susceptible *S. aureus* infection: a prospective investigation, *Clin. Infect. Dis.* 44 (2007) 471–482.
- [2] G.J. Moran, A. Krishnadasan, R.J. Gorwitz, G.E. Fosheim, L.K. McDougal, R.B. Carey, D.A. Talan, E.M.I.N.S. Group, Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department, *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 666–674.
- [3] N.E. Holmes, P.D. Johnson, B.P. Howden, Relationship between vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-intermediate *S. aureus*, high vancomycin MIC, and outcome in serious *S. aureus* infections, *J. Clin. Microbiol.* 50 (2012) 2548–2552.
- [4] G.T. Ray, J.A. Suaya, R. Baxter, Trends and characteristics of culture-confirmed *Staphylococcus aureus* infections in a large U.S. integrated health care organization, *J. Clin. Microbiol.* 50 (2012) 1950–1957.
- [5] E.C.f.C.a.D. Prevention, <http://www.ecdc.europa.eu/>, 2014.
- [6] J.M. de Lira, M. Maruza, M. Verza, M.M. Carneiro, F. de Albuquerque Mde, M.L. Rossetti, R. Ximenes, M.C. Braga, N. Lucena-Silva, Evaluation of four molecular methods for the diagnosis of tuberculosis in pulmonary and blood samples from immunocompromised patients, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109 (2014) 805–813.
- [7] P. Van Lint, E. De Witte, H. De Henau, A. De Muynck, L. Verstraeten, B. Van Herendaël, S. Weekx, Evaluation of a real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp./EIEC, and *Yersinia enterocolitica* in fecal samples, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (3) (2015 Mar) 535–542, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-014-2257-x> (Epub 2014 Oct 19).
- [8] A. Kjerulf, F. Espersen, M. Tvede, IgG antibody-response in bacterial-endocarditis using elisa with multiple antigens, *Apmis* 102 (1994) 736–742.
- [9] R.W. Watkin, S. Lang, P.A. Lambert, W.A. Littler, T.S.J. Elliott, The serological diagnosis of staphylococcal infective endocarditis, *J. Infect.* 53 (2006) 301–307.
- [10] A. Kumar, P. Ray, M. Kanwar, M. Sharma, S. Varma, A comparative analysis of antibody repertoire against *Staphylococcus aureus* antigens in patients with deep-seated versus superficial staphylococcal infections, *Int. J. Med. Sci.* 2 (2005) 129–136.
- [11] S. van den Berg, M.G. Bowden, T. Bosma, G. Buist, J.M. van Dijk, W.J. van Wamel, C.P. de Vogel, A. van Belkum, I.A.J.M. Bakker-Woudenberg, A multiplex assay for the quantification of antibody responses in *Staphylococcus aureus* infections in mice, *J. Immunol. Methods* 365 (2011) 142–148.
- [12] U. Ryding, F. Espersen, B. Soderquist, B. Christensson, Evaluation of seven different enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42 (2002) 9–15.
- [13] H.A. Verbrugh, J. Verhoef, B.J. Wilkinson, P.K. Peterson, Biology and clinical significance of peptidoglycan antibody response in staphylococcal infections, *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 41 (1983) 117–125.
- [14] K.A. Wise, F.A. Tosolini, Detection of teichoic-acid antibodies in staphylococcus-aureus infections, *Pathology* 24 (1992) 102–108.
- [15] W.H. Traub, D. Bauer, B. Leonhard, Immunobiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: immune response of rabbits and patients to systemic infection, *Chemotherapy* 42 (1996) 118–132.
- [16] J.H. Yoon, Y.D. Han, P.C. Lee, H.C. Yoon, Lysostaphin-mediated fragmentation of microbial peptidoglycans for label-free electrochemical impedance immunoanalysis of *Staphylococcus aureus*, *Biochip J.* 7 (2013) 344–352.
- [17] S. Wiriyachaiyorn, P.H. Howarth, K.D. Bruce, L.A. Dailey, Evaluation of a rapid lateral flow immunoassay for *Staphylococcus aureus* detection in respiratory samples, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75 (2013) 28–36.
- [18] A.R. Zeiger, Use of a synthetic peptidoglycan-precursor immunogen and its antibodies as a probe of infectious diseases in man, *Dev. Biol. Stand.* 63 (1986) 109–115.
- [19] H.I. Wergeland, K.B. Asbakk, L.R. Haaheim, Monoclonal antibodies evoked by the free oligopeptide (Gly)5 reacting specifically with peptidoglycan from staphylococci, *J. Immunol. Methods* 104 (1987) 57–63.
- [20] G.J. Merkel, B.A. Scofield, Characterization of a monoclonal antibody that binds to an epitope on soluble bacterial peptidoglycan fragments, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8 (2001) 647–651.
- [21] S. Sandhu, J.A. Schouten, J. Thompson, M. Davis, T.D.H. Bugg, Detection of *Staphylococcus aureus* cell walls by enzyme-linked immunoassay using antibodies prepared from a semi-synthetic peptidoglycan precursor, *Analyst* 137 (2012) 1130–1136.
- [22] S. Sharif, M. Singh, S.J. Kim, J. Schaefer, *Staphylococcus aureus* Peptidoglycan tertiary structure from carbon-13 spin diffusion, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 7023–7030.
- [23] A. Bera, S. Herbert, A. Jakob, W. Vollmer, F. Götz, Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*, *Mol. Microbiol.* 55 (2005) 778–787.
- [24] B. Glauner, Separation and quantification of mucopeptides with high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 172 (1988) 451–464.
- [25] L. Gan, S. Chen, G.J. Jensen, Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 18953–18957.
- [26] T. Kern, M. Giffard, S. Hediger, A. Amoroso, C.C. Giustini, N.K. Bui, B. Joris, C. Bougault, W. Vollmer, J.-P. Simorre, Dynamics characterization of fully hydrated bacterial cell walls by solid-state NMR: evidence for cooperative binding of metal ions, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 10911–10919.
- [27] W. Vollmer, J.V. Holtje, The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J. Bacteriol.* 186 (2004) 5978–5987.
- [28] I.G. Boneca, Z.H. Huang, D.A. Gage, A. Tomasz, Characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall glycan strands, evidence for a new beta-N-acetylglucosaminidase activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 9910–9918.
- [29] S. Sharif, S.J. Kim, H. Labischinski, J. Schaefer, Characterization of peptidoglycan in fem-deletion mutants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by solid-state NMR, *Biochemistry* 48 (2009) 3100–3108.
- [30] K.H. Schleifer, O. Kandler, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriol. Rev.* 36 (1972) 407–477.
- [31] S.J. Kim, M. Singh, S. Sharif, J. Schaefer, Cross-link formation and peptidoglycan lattice assembly in the fema mutant of *Staphylococcus aureus*, *Biochemistry* 53 (2014) 1420–1427.
- [32] W. Vollmer, Bacterial outer membrane evolution via sporulation? *Nat. Chem. Biol.* 8 (2012) 14–18.
- [33] H.I. Wergeland, L.R. Haaheim, O.B. Natas, F. Wesenberg, P. Oeding, Antibodies to staphylococcal peptidoglycan and its peptide epitopes, teichoic acid, and lipoteichoic acid in sera from blood donors and patients with staphylococcal infections, *J. Clin. Microbiol.* 27 (1989) 1286–1291.
- [34] P.H. Seidl, K.H. Schleifer, The immunochemistry of peptidoglycan, *Eur. J. Biochem.* 74 (1977) 353–363.
- [35] D.G. Pinacho, F. Sanchez-Baeza, M.P. Marco, Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4527–4534.
- [36] B. Ballesteros, D. Barceló, F. Camps, M.-P. Marco, Preparation of antisera and

- development of a direct enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the antifouling agent Irgarol 1051, *Anal. Chim. Acta* 347 (1997) 139–147.
- [37] S. Li, S. Norioka, F. Sakiyama, Purification, staphylolytic activity, and cleavage sites of aaaa-lytic protease from *Achromobacter lyticus*, *J. Biochem.* 122 (1997) 772–778.
- [38] X. Zhou, L. Cegelski, Nutrient-dependent structural changes in *S. aureus* peptidoglycan revealed by solid-state NMR spectroscopy, *Biochemistry* 51 (2012) 8143–8153.
- [39] R. Galve, F. Sanchez-Baeza, F. Camps, M.P. Marco, Indirect competitive immunoassay for trichlorophenol determination: rational evaluation of the competitor heterology effect, *Anal. Chim. Acta* 452 (2002) 191–206.
- [40] J. Adrian, H. Font, J.-M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, M.P. Marco, Generation of broad specificity antibodies for sulfonamide antibiotics and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of milk samples, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 385–394.
- [41] J.I.A. Man, W. Chesbro, Detection of *Staphylococcus aureus* products in foods using enzyme linked immunosorbent assay and spectrophotometric thermocyclase assay, *J. Food Saf.* 3 (1980) 15–25.
- [42] T.C. Majumdar, R., U. Raychaudhuri, Study on enzyme-linked immunoassay and polymerase chain reaction for the identification and quantification of *Staphylococcus aureus* in pure culture and food samples, *ISCA J. Biol. Sci.* 1 (3) (2012) 30–36.
- [43] A.S.B. Edge, C.R. Faltynek, L. Hof, L.E. Reichert, P. Weber, Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid, *Anal. Biochem.* 118 (1981) 131–137.
- [44] H.T. Sojar, O.P. Bahl, A chemical method for the deglycosylation of proteins, *Archives Biochem. Biophys.* 259 (1987) 52–57.
- [45] W. Vollmer, B. Joris, P. Charlier, S. Foster, Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases, *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (2008) 259–286.
- [46] P. Szweđa, M. Schielmann, R. Kotlowski, G. Gorczyca, M. Zalewska, S. Milewski, Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 1157–1174.
- [47] J. Humann, L.L. Lenz, Bacterial peptidoglycan-degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection, *J. Innate Immun.* 1 (2009) 88–97.
- [48] L. Barton, *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*, Springer, New York, 2005.
- [49] Y.P. Krespi, V. Kizhner, L. Nistico, L. Hall-Stoodley, P. Stoodley, Laser disruption and killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms, *Am. J. Otolaryngol.* 32 (2011) 198–202.
- [50] G.R. Hirschfield, M. McNeil, P.J. Brennan, Peptidoglycan-associated polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 1005–1013.
- [51] W.W. Navarre, H. Ton-That, K.F. Faull, O. Schneewind, Anchor structure of staphylococcal surface proteins. II. CooH-terminal structure of muramidase and amidase-solubilized surface protein, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 29135–29142.
- [52] J. Kumar, Lysostaphin: an antistaphylococcal agent, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (2008) 555–561.
- [53] A.J. Kirby, The lysozyme mechanism sorted [mdash] after 50 years, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 8 (2001) 737–739.
- [54] H.J. Singer, E.M. W., J.T. Park, Properties and purification of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Staphylococcus aureus* H, *J. Bacteriol.* 112 (1972) 932–939.
- [55] S. Li, S. Norioka, F. Sakiyama, Purification, characterization, and primary structure of a novel cell wall hydrolytic amidase, CwhA, from *Achromobacter lyticus*, *J. Biochem.* 127 (2000) 1033–1039.
- [56] J.W. Tams, K.G. Welinder, Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme, *Anal. Biochem.* 228 (1995) 48–55.
- [57] P. Corne, H. Marchandin, O. Jonquet, J. Campos, A.-L. Banuls, Molecular evidence that nasal carriage of *Staphylococcus aureus* plays a role in respiratory tract infections of critically ill patients, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 3491–3493.
- [58] F. Wallet, T. Perez, S. Armand, B. Wallaert, R.J. Courcol, Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a cystic fibrosis patient: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation, *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 2300–2301.
- [59] W.E. Rose, S.N. Leonard, K.L. Rossi, G.W. Kaatz, M.J. Rybak, Impact of inoculum size and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) on vancomycin activity and emergence of VISA in an in vitro pharmacodynamic model, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 805–807.

**An Immunochemical Strategy based on Peptidoglycan Synthetic Peptide Epitopes to
Diagnose *Staphylococcus aureus* Infections**

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Carme Pastells^{a,c}, Gerardo Acosta^{b,c}, Nuria Pascual^{a,c} Fernando Albericio^{b,c,d,e}, Miriam
Royo^{b,c} and M.-Pilar. Marco^{a,c,#}

*Nanobiotechnology for Diagnostics (Nb4D), IQAC-CSIC, Barcelona, Spain^a.
Combinatorial Chemistry Unit, Barcelona Science Park, Barcelona, Spain^b. Networking
Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN),
Spain^c. Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, Barcelona^d. School
of Chemistry, University of Kwa-Zulu-Natal, Durban, South Africa^e.*

Running Head: Immunochemical detection of *S.aureus* peptidoglycan

#Address correspondence to M.-Pilar Marco, pilar.marco@cid.csic.es

EXPERIMENTAL SECTION

General Methods and Instruments. The MALDI-TOF/TOF-MS (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer) used to characterize the protein conjugates was an AutoFLEX (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with smartbeam laser operated at 200-Hz. The pH and the conductivity of all buffers and solutions were measured with a pH meter pH 540 GLP and a conductimeter LF 340, respectively (WTW, Weilheim, Germany). Protein purification was performed by dialysis using regenerated cellulose tubular membrane with a 12,000-14,000 molecular weight cut-off (Cellu-Sep T-Series Membranes; Membrane Filtration Products Inc., Seguin, USA) or using size-exclusion chromatography (HiTrap Sephadex G-25 Superfine columns; Amersham Biosciences). Polystyrene microtiter plates were purchased from Nunc (Maxisorp, Roskilde, Denmark). Washing steps were carried out using a ELx405 HT microplate washer (BioTek, Winooski, Vermont, USA). Absorbances were read using a SpectamaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at a single wavelength mode of 450 nm. The competitive curves were analyzed with a four-parameter logistic equation using the software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices), and GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $Y = \frac{[A-B]}{1 - (x/C)^D} + B$, where A is the maximal signal, B is the minimum signal, C is the concentration producing 50% of the maximal signal, and D is the slope at the inflection point of the curve.

Peptide synthesis

PSau3, *PSau4*, *PSau5*, *PSau6*, *PSau7* and *PSau8* were synthesized manually on polypropylene syringes fitted with a polyethylene porous disk using the adequate

polymeric support for each peptide. *PSau3*, *PSau4*, *PSau5* and *PSau6* were synthesized using 2-chloro trityl (2-CTC) resin (600 mg; 1 mmol g⁻¹) and H-Rink Amide ChemMatrix resin (600 mg, 0.53 mmol g⁻¹) was employed for the synthesis of *PSau7* and *PSau8* peptides. Solvents and soluble reagents were removed by suction. The *PSau* peptides were synthesized using a Fmoc/tBu/Alloc strategy, using in all cases Fmoc-Llys(Alloc)-OH for the Llys on the third position at the first stem peptide and Fmoc-Llys(Boc) for the Llys located on the second stem peptide. Fmoc-DGlu-NH₂ was used for the synthesis of *PSau5*, *PSau6*, *PSau7* and *PSau8* and Fmoc-DGln(Trt)-OH for *PSau3* and *PSau4*. *PSau3*, *PSau6* and *PSau8* contain a Cys at the N-terminal position of first stem peptide. *PSau4* contains a Cys at the N-terminal position of the second stem peptide. Fmoc-LCys(Trt) was employed to incorporate the LCys into these four peptides.

For *PSau3*, *PSau4*, *PSau5* and *PSau6*, previous to the introduction of the first amino acid 2-CTC resin was washed with DMF (3 x 5 mL x 1 min) and CH₂Cl₂ (3 x 5 mL x 1 min). Fmoc-DAla-OH (1 equiv.) and DIEA (10 equiv.) in CH₂Cl₂ were added to the resin, and the mixture was shaken for 55 min at 25°C. The resin was capped by adding MeOH for 10 min at 25°C, and then washed with DMF (5 x 3 mL x 1 min) and CH₂Cl₂ (5 x 3 mL x 1 min). For *PSau7* and *PSau8* the introduction of the first amino acid (DAla) was achieved using standard coupling conditions.

In all *PSau* peptides, first stem peptide sequence was synthesized and acetylated at the N-terminal position. Then, Alloc group was eliminated and the amino acids necessary to build the pentaglycyl bridge and the second peptide stem were introduced. Finally Fmoc group was removed from the N-terminal position of the second peptide stem and the amine acetylated. Coupling reactions were performed using the corresponding

Fmoc-amino acids (3 equiv.) and DIC (3 equiv.) and HOAt (3 equiv.) as coupling reagents system in DMF for 1 hour. The Fmoc group was eliminated by treatment with piperidine-DMF (1:4 v/v; 2 x 5 min). The Kaiser colorimetric assay was used to evaluate the completion of the amino acid incorporation. When was necessary recoupling were done using HBTU (3 equiv.), HOAt (3 equiv.) and DIEA (4 equiv.) in DMF as coupling reagent system for 40 min.

Acetylations were carried out with acetic anhydride (10 equiv.), DIEA (10 equiv.) in DCM for 15 min. The Alloc group was removed with treatments with tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.1 equiv.), phenylsilane (10 equiv.) in DCM (3 x 15 min). Peptides were cleaved from the peptide-resin by treatment with TFA-H₂O-TIS (95:2.5:2.5) during 1 hour. Then TFA was then removed by evaporation and peptides were precipitated by addition of cold anhydrous diethylether, centrifuged and the supernatant was discarded. The solid was dissolved in H₂O-MeCN (1:1) and freeze-dried. Peptides were characterized by HPLC and HPLC-MS.

PSau crude peptides were purified by RP-HPLC semi-preparative chromatography using a linear gradient from 0%B to 50%B in 10 minutes at a flow rate of 16 mL/min and the UV detection was at 220 nm. Elution system: A:H₂O:TFA (99:1, v/v) and B: CH₃CN (99:1), v/v).

PSau3: 62 mg, 98.3% purity (determined by HPLC at 220 nm). Theoretical mass for C₅₄H₈₇N₁₉O₁₈S: 1358.48; found by LC-MS(ES): 1359.0 [M+H]⁺

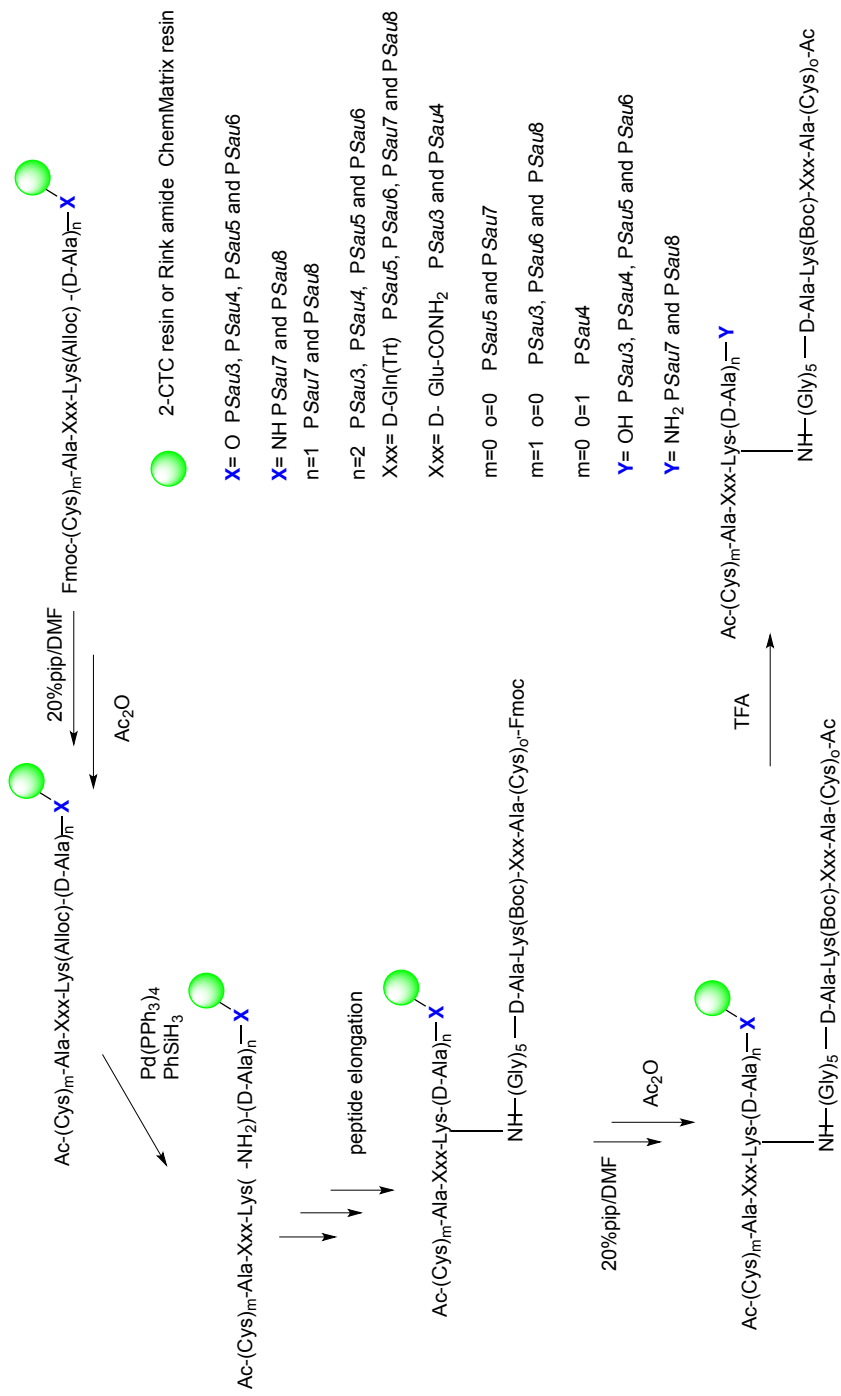
PSau4: 62 mg, 99.9% purity (determined by HPLC at 220 nm). Theoretical mass for C₅₄H₈₇N₁₉O₁₈S: 1358.48; found by LC-MS(ES): 1359.0 [M+H]⁺

PSau5: 35 mg, 96.2% purity (determined by HPLC at 220 nm). Theoretical mass for $C_{54}H_{87}N_{19}O_{18}S$: 1358.48; found by LC-MS(ES): 1359.0 [M+H]⁺

PSau6: 5 mg, 99.9% purity (determined by HPLC at 220 nm). Theoretical mass for $C_{54}H_{87}N_{19}O_{18}S$: 1358.48; found by LC-MS(ES): 1360.18 [M+H]⁺ and 644.77 [M+2H]²⁺

PSau7: 38 mg; 99.9% purity (determined by HPLC at 220 nm). Theoretical mass for $C_{48}H_{82}N_{18}O_{17}$: 1183.28 ; found by LC-MS(ES) : 1184.65 [M+H]⁺ and 593.04 [M+2H]²⁺

PSau8: 47 mg, 99.9% purity (determined by HPLC at 220 nm). Theoretical mass for $C_{51}H_{87}N_{19}O_{18}S$: 1286.42; found by LC-MS(ES) : 1287.69 [M+H]⁺ and 644.5 [M+2H]²⁺



Pastells et al. Figure S1

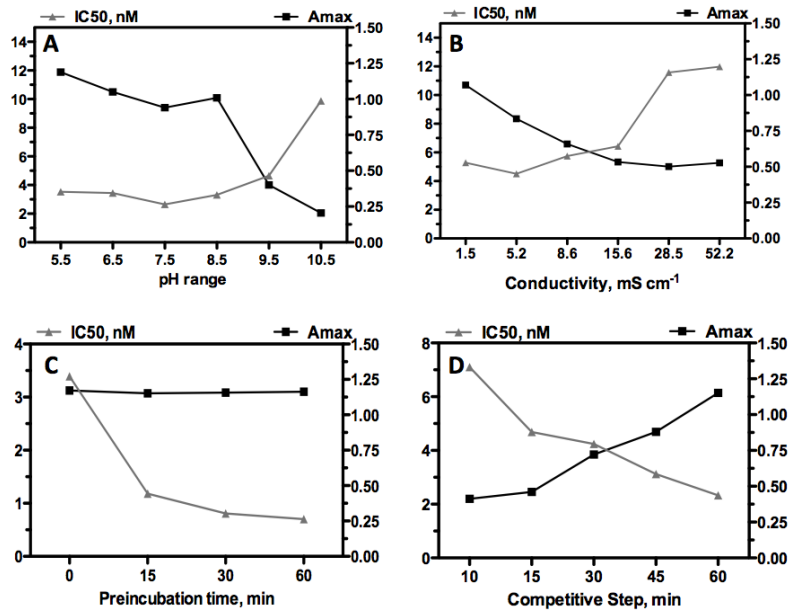
FIG S1. Peptides P Sauv3, P Sauv4, P Sauv5, P Sauv6, P Sauv7 and P Sauv8 synthesis scheme.

IMMUNOCHEMISTRY

Matrix effect studies. The solution resulting from the deglycosylation of a blank aqueous extract, and the BAS and BAL samples deglycosylated were used to prepare standard curves. The curves were run in the ELISA to compare the parallelism with the standard curve prepared in PBST-D.

Experiments to assess ELISA performance. Deglycosylated and non-deglycosylated buffer, BAL and BAS samples were spiked with different concentrations of *PSau7*, PG, *S. aureus*, *E. Coli* or *P. aeruginosa* and measured in the ELISA using *PSau7* as reference standard and the corresponding immunochemical procedure depending on whether the sample has been or not deglycosylated. Results were expressed as *PSau7* immunoreactivity equivalents (IR equiv).

RESULTS



Pastells et al., Figure S2

FIG S2. Graphs showing the effects of different physical-chemical parameters on the *As291/PSau3*-BSA immunoassay. The experiments have been performed using with PG as standard in PBST. **Graph A:** Effect of the pH of the assay buffer; **Graph B:** Effect of the ionic strength; **Graph C:** Effect of the time of a preincubation step between the antibody and the analyte; **Graph D:** Effect of the length of the competitive step. As it can be observed, the assay works better in high ionic strength conditions. On the other hand, 15 min of preincubation time and higher competition times improves significantly the assay detectability. Data was obtained from calibration curves performed under the different conditions shown. Calibration curves were run using three well replicates for each concentration.

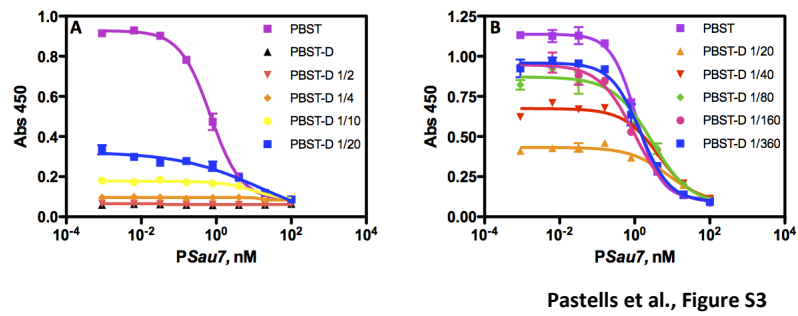


FIG S3. Evaluation of the deglycosylation extract matrix effect on the As291/*PSau3*-MPCO-BSA ELISA.

Considering that the TFMSA treatment could alter not only the PG, but also the physic-chemical features of the solution, on a first step, we assessed the potential nonspecific interferences caused by this sample treatment in the As291/*PSau3*-MPCO-BSA ELISA. For this purpose, we run the whole procedure, as it is described in the experimental section, but in the absence of matrix, and used the final solution to prepare standard curves. As it can be observed, the signal almost completely inhibited in this media. The extract had to be diluted at least 80 times in order to have a usable assay, which it would decrease substantially the detectability.

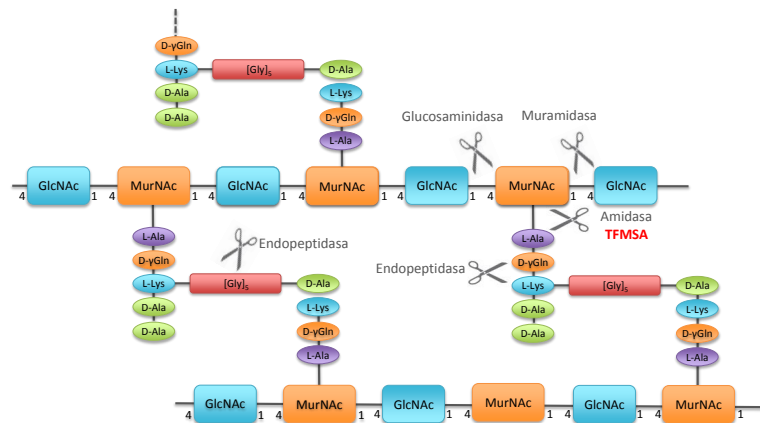


FIG S4. Schematic representation of the peptidoglycan structure. The basic building block comprises the two aminosugars N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc), which are connected by a β-1,4-glycosidic bond and an a peptide moiety that is attached to the lactyl group of the MurNAc unit. The figure also shows the cleavage site of the different types of enzymes and TFMSA. This figure has been modified from Thanbichler et al.¹, with the permission of the authors.

Enzymatic methods are extremely restrictive due to the specificity of the active binding site; therefore mutations in the bacterial cell wall inactivate their activity. In particular, *S. aureus* presents resistivity to lysozyme^{2,3} due to the O-acetylation of the hydroxyl at C6 of the MurNAc. The endopeptidase lysostaphin, although it has been reported to be one of the most efficient enzymes to hydrolyze the *Staphylococcus* cell wall, was not an option in this case, since its selectivity is addressed towards the specific pentaglycine peptide bridge, and we needed to

preserve this moiety for antibody recognition. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases could have been a reasonable alternative with its bacteriolytic activity cleaving the linkage between the polysaccharide and the peptide subunits⁴⁻⁶ but we were not able to acquire them from commercial sources. Under this scenario, we opted for the chemical hydrolysis using trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA)⁷⁻⁹. TFMSA is non-dependent of the mutations, leaves the peptidic chains unaffected and results in destruction of the glycan moiety.

TABLE S1. Hapten densities of the peptide-protein bioconjugates.

immunoreagent	d-hapten ^a	% conjugation ^b
PSau3-MP-BSA	2	5-6
PSau4-MP-BSA	2	5-6
PSau6-CH ₂ CO-BSA	6	20-17
PSau8-CH ₂ CO-BSA	9	26-30

Analyses were performed by MALDI-TOF/TOF-MS. ^a Moles per hapten per mole of protein. ^b The conjugation is calculated on the basis of the assumption that the BSA has 30-35 free lysine groups

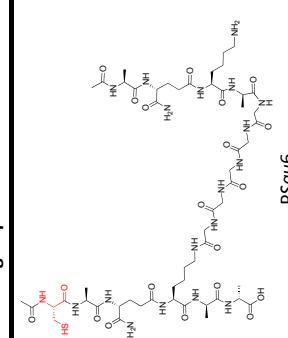
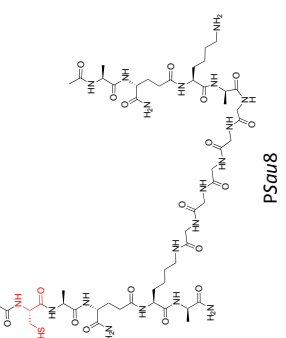
TABLE S2. Results from the recovery studies of the chemical deglycosylation procedure.

Spiked, nM	Measured, nM (% recovery)	
	PBST	PBST-D
22	19.5 ± 0.88 (88)	21.1 ± 0.99 (96)
23	25.1 ± 1.05 (109)	26.5 ± 0.98 (115)

Samples were spiked with *PSau7* and measured by ELISA before, and after the deglycosylation treatment. The results shown are the average of three samples spiked with the same concentration. Analysis were performed in three-well replicates

The recovery was evaluated by running the procedure on samples spiked at known concentrations of *PSau7*, obtaining recoveries close 100%. These results indicate that the peptidic epitopes were not affected by the treatment, since the immunoreactivity equivalents (IR equiv.) measured before and after the treatment were not significantly different.

TABLE S3: Immunoassay features of the indirect competitive ELISAs using PG solutions as standards

Immunizing Hapten	Heterol.	Assay	Abs _{max}	Abs _{min}	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Slope	R ²	
 <p>PSau6</p>		As288/PSau4-MPCO-BSA	1.033	0.225	3.08	-1.32	0.990	
		As288/PSau3-MPCO-BSA	1.055	0.251	2.63	-1.75	0.982	
		As288/PSau8-CH ₂ CO-BSA	0.922	0.331	4.91	-1.06	0.993	
		As288/PSau6-CH ₂ CO-BSA	0.936	0.208	2.58	-1.52	0.984	
		As289/PSau4-MPCO-BSA	0.820	0.208	2.58	-1.21	0.977	
		As289/PSau3-MPCO-BSA	1.343	0.226	1.23	-0.92	0.989	
		As289/PSau8-CH ₂ CO-BSA	0.926	0.263	1.68	-0.98	0.995	
		As289/PSau6-CH ₂ CO-BSA	1.167	0.325	2.26	-1.15	0.995	
	 <p>PSau8</p>		As290/PSau4-MPCO-BSA	0.718	0.154	2.07	-1.73	0.977
			As290/PSau3-MPCO-BSA	1.125	0.221	2.69	-1.66	0.989
		As290/PSau6-CH ₂ CO-BSA	1.441	0.239	3.44	-1.32	0.995	
		As290/PSau8-CH ₂ CO-BSA	1.661	0.296	6.61	-1.14	0.995	
		As291/PSau4-MPCO-BSA	0.806	0.149	1.20	-1.31	0.987	
		As291/PSau3-MPCO-BSA	1.340	0.165	1.59	-1.38	0.993	
		As291/PSau6-CH ₂ CO-BSA	1.445	0.274	6.66	-1.02	0.997	
		As291/PSau8-CH ₂ CO-BSA	1.790	0.299	12.43	-0.78	0.991	

REFERENCES

- (1) Thanbichler, M.; Shapiro, L. *Nature reviews. Microbiology* **2008**, *6*, 28-40.
- (2) Kumar, J. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, *80*, 555-561.
- (3) Kirby, A. J. *Nat Struct Mol Biol* **2001**, *8*, 737-739.
- (4) Li, S.; Norioka, S.; Sakiyama, F. *Journal of Biochemistry* **1997**, *122*, 772-778.
- (5) SINGER, H. J.; M., W. E.; PARK, J. T. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* **1972**, *112*, 932-939.
- (6) Li, S.; Norioka, S.; Sakiyama, F. *Journal of Biochemistry* **2000**, *127*, 1033-1039.
- (7) Edge, A. S. B.; Faltynek, C. R.; Hof, L.; Reichert, L. E.; Weber, P. *Analytical Biochemistry* **1981**, *118*, 131-137.
- (8) Sojar, H. T.; Bahl, O. P. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1987**, *259*, 52-57.
- (9) Tams, J. W.; Welinder, K. G. *Analytical Biochemistry* **1995**, *228*, 48-55.

3.5 RESUM DELS RESULTATS DEL CAPÍTOL 3

El pentapèptid de cinc glicines característic de la paret bacteriana de *S. aureus* ha estat la diana seleccionada contra la qual s'han produït anticossos específics. Els anticossos obtinguts han permès desenvolupar assajos immunoquímics per a la detecció de *S. aureus* (vegeu Figura 3.16A), tant en format ELISA com en format de micromatriu, tot i que els resultats d'aquest últim format són encara preliminars.

La Figura 3.16 mostra les corbes de calibratge obtingudes en l'ELISA As291/PSau3-BSA amb PG (B) i els pèptids PSau5 i PSau7 (C) com a estàndards. Tot i que tant PSau5 com PSau7 donen respostes pràcticament idèntiques el PSau7 es va seleccionar com a referència per a futurs treballs on les respostes de les mostres analitzades es donaran com a immunoreactivitat de PSau7.

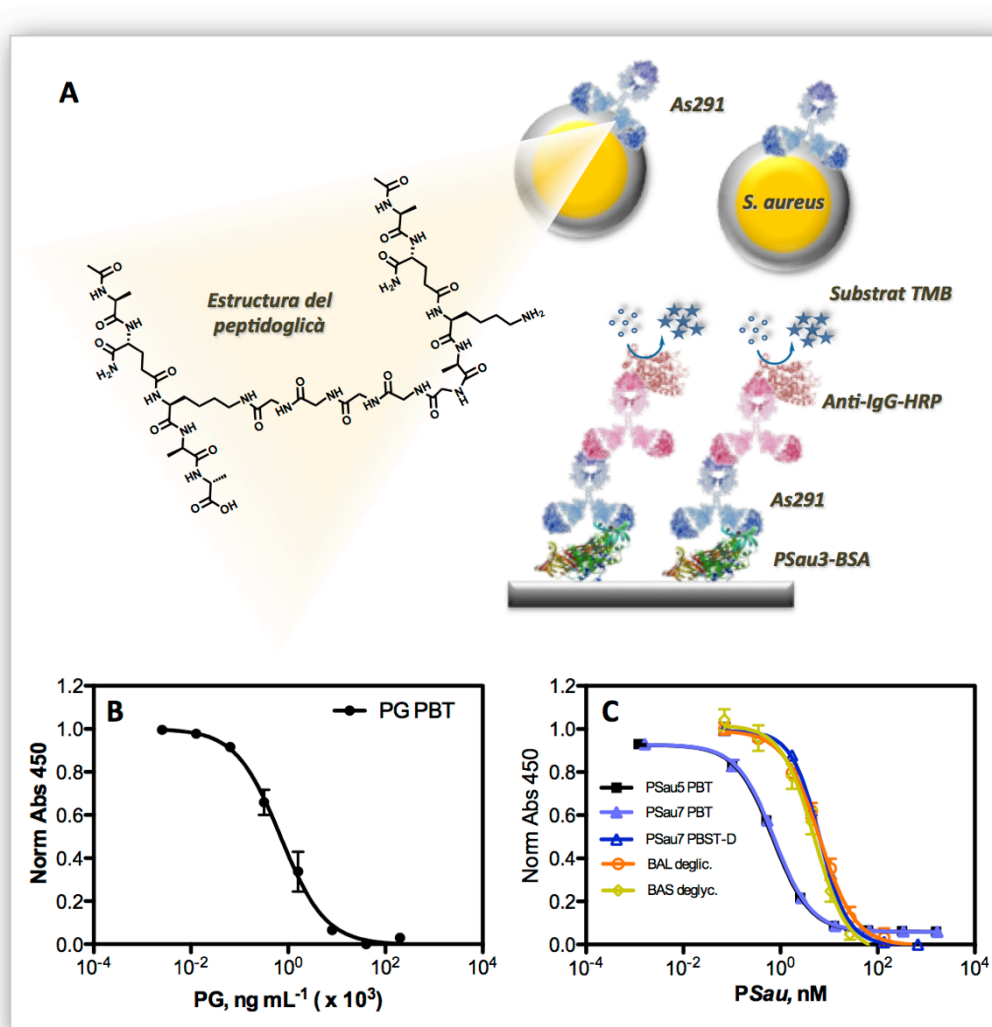


Figura 3.16 A. Esquema de l'assaig ELISA en format indirecte competitiu i estructura de l'epítoc del peptidoglicà que reconeixen els anticossos obtinguts. B. Corba de calibratge del PG en tampó (PBT) C. Corba de calibratge del PSau5 i/o PSau7 en tampó PBT, en extracte de deglicosilació (PBST-D), BAL deglicosilat (BAL deglic.) i BAS deglicosilat (BAS deglic.).

A fi de millorar la detectabilitat de l'assaig ELISA As291/PSau3-BSA, es varen estudiar diferents mètodes de lisis o trancament de la paret bacteriana. De tots els mètodes estudiats, la deglicosilació amb TFMSA va resultar ser el més efectiu. Per a l'anàlisi de mostres tractades amb TFMSA, va ser necessari efectuar un previ estudi d'efecte matriu, amb una simple dilució i reajustament de les concentracions d'immunoreactius de l'assaig va ser possible obtenir una bona corba de calibratge (vegeu corba PSau7 PBST-D de la Figura 3.16) en la matriu del tractament químic i es va poder procedir a la quantificació de mostres deglicosilades en l'assaig ELISA. Els resultats satisfactoris del tractament amb TFMSA es veuen reflectits amb un augment de la immunoreactivitat de les solucions tractades, tant en extractes de PG com per a les suspensions de *S. aureus*, assolint LOD de 10^4 CFU mL⁻¹ en mostres tractades, mentre en mostres no tractades el LOD era tres ordres de magnitud major.

Per últim, l'assaig es va implementar en mostres clíniques d'òrgien respiratori. Primer es va estudiar les interaccions no específiques que produïen les mostres de BAL i de BAS deglicosilades sobre l'assaig i en segon lloc, es varen analitzar mostres de *S. aureus* deglicosilades en BAL i BAS. Tal i com mostra Figura 3.16C, les interaccions no específiques de les mostres de BAL i BAS queden pràcticament minimitzades un cop se'ls ha aplicat el tractament de deglicosilació (vegeu cobres BAL i BAS delgic. vs cobra de PBST-D, l'extracte blanc deglicosilat). I de la mateixa manera, les mostres de *S. aureus* en BAL i BAS varen donar valors de immunoreactivitat de PSau7 semblant als obtinguts per a les mostres de *S. aureus* dopades en tampó.

La Taula 3.4 mostra el paràmetres de les corresponents corbes de calibració representades en la Figura 3.16.

El conjunt d'aquest treball demostra el desenvolupament d'una tècnica robusta i reproduïble de gran interès per a la caracterització de diferents extractes de PG així com també una eina de diagnòstic amb gran potencial per a ser implementada en tests ràpids de diagnòstic de malalties infeccioses.

Taula 3.4. Paràmetres dels immunoassajos per a la detecció de *S. aureus* en tampó PBST i matriu provinents del tractament de deglicosilació (PBST-D) amb PSau7 i PG com a estàndards.

Analit➤	PSau5		PSau7			PG ^a
	PBT ^b	PBT ^c	PBT-D ^{c,d}	BAL Deglic. ^{c,d}	BAS Deglic. ^{c,d}	PBT ^b
A _{max}	0,926 ± 0,010	0,926 ± 0,010	1,609 ± 0,039	1,696 ± 0,043	1,612 ± 0,061	98,76 ± 1,510
A _{min}	0,059 ± 0,006	0,059 ± 0,006	0,089 ± 0,044	0,166 ± 0,042	0,152 ± 0,056	-1,274 ± 1,983
Pendent	-1,14 ± 0,06	-1,14 ± 0,06	-1,26 ± 0,09	-1,17 ± 0,14	-1,27 ± 0,22	-1,15 ± 0,13
IC ₅₀ , ng mL ⁻¹	0,86 ± 0,03	0,85 ± 0,06	19,05 ± 1,36	18,92 ± 1,55	14,98 ± 2,20	1002 ± 920
nM o nmol Kg ⁻¹	0,69 ± 0,02 ^e	0,72 ± 0,05 ^e	16,05 ± 1,15 ^e	128,10 ± 10,75 ^f	101,20 ± 14,93 ^f	-
LOD, ng mL ⁻¹	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,01	4,20 ± 0,28	1,13 ± 0,43	1,11 ± 0,22	120 ± 90
nM or nmol Kg ⁻¹	0,10 ± 0,01 ^e	0,11 ± 0,01 ^e	3,43 ± 0,23 ^e	19,08 ± 7,35 ^f	18,8 ± 3,7 ^f	-
R ²	0,998 ± 0,001	0,999 ± 0,001	0,931 ± 0,154	0,958 ± 0,126	0,878 ± 0,219	0,995 ± 0,004

^a El pes molecular del PG es desconeix. Els assajos s'han fet per segons les condicions indicades a la taula en microplaques emprant triplicats dels pous en cada experiment. PBST indica que el protocol de l'immunoassaig era per a mostres no-deglicosilades, mentre que PBST-D indica que l'assaig va ser realitzat en les condicions de les mostres deglicosilades. ^b Les dades mostrades són la mitjana i la desviació estàndard dels paràmetres del ajust de les corbes de calibratge fets en dos dies diferents. ^c Les dades mostrades són la mitjana i la desviació estàndard dels paràmetres del ajust de les corbes de calibratge fets en tres dies diferents. ^d Als valors de IC₅₀ i LOD se'ls ha aplicat un factor de multiplicació de 2,5 resultant del tractament de deglicosilació. ^e Els valors estan expressats en nM. ^f Els valors estan expressats en nmols de PSau7 Kg⁻¹ de BAL o BAS segons la mostra.

3.6 PRINCIPALS APORTACIONS DEL TREBALL DESCRIT EN AQUEST CAPÍTOL

Les principals aportacions del treball d'investigació descrit en aquest capítol són les següents:

- Tot i que ja s'havien descrit anticossos contra la paret del peptidoglicà de *S. aureus*^{106,112}, en aquest treball es selecciona una diana molt específica i que conté el pont de cinc glicines específic d'aquest bacteri i s'aporta un nou disseny d'haptens contra aquesta fracció de la paret basat exclusivament en la part peptídica del PG.
- Amb els anticossos produïts s'han desenvolupat immunoassajos de tipus ELISA competitiu indirecte en format de microplaca i en un assaig en format de micromatriu. L'ELISA As291/PSau3-BSA desenvolupat és capaç de detectar PG amb un LOD de 120 ± 90 ng mL⁻¹ i PSau7 amb un LOD de 0,10 ± 0,01 ng mL⁻¹ (0,09 ± 0,01 nM).
- S'ha demostrat que un tractament químic (TFMSA) del PG i de la bactèria millora la disponibilitat pel reconeixement dels epítops peptídics de la paret bacteriana seleccionats, assolint LOD de de 10⁴ CFU mL⁻¹ de *S. aureus*, dos ordres de magnitud millor que quan no es fa aquest tractament. Això ha requerit una sèrie de modificacions del protocol immunoquímic per minimitzar l'efecte matriu produït pel mètode químic de deglicosilació i s'ha

obtingut un assaig per a la quantificació de mostres deglicosilades amb un LOD de $3,43 \pm 0,23$ nM ($4,20 \pm 0,28$ ng mL⁻¹) pel Psau7.

- Com a prova de concepte, el mètode desenvolupat s'ha aplicat a mostres d'origen respiratori (BAL i BAS). Un cop deglicosilades la resposta immunoquímica d'aquestes mostres en l'ELISA As291/Psau3-BSA és pràcticament idèntica a la obtinguda per les corbes amb tampó de deglicosilació (PBST-D). De la mateixa manera, les mostres de BAL i BAS fortificades a concentracions conegudes de *S. aureus* també donen una resposta en equivalents de immunoreactivitat (IR equiv.) del Psau7, així com de CFU mL⁻¹ de bacteri, semblants a les obtingudes amb les mostres de tampó fortificades. No obstant això, els LOD assolits foren inferiors, 10⁵ i 10⁶ CFU mL⁻¹ per BAS i BAL, respectivament.

En resum, és la primera vegada que anticossos contra el PG de *S. aureus* s'apliquen per quantificar aquest bacteri en mostres clíniques. El procediment immunoquímico establert pretén donar informació sobre l'extensió de la infecció en base als IRequiv del epítoc peptídico seleccionat (Psau7). Un tractament de deglicosilació establert per Albert Edge al 1981^{140,141} aplicat a l'ELISA As291/Psau3-MP-BSA ha permet incrementar el nombre de epítocs peptídics alliberats i disponibles pel reconeixement per part de l'anticòs, millorant així la detectabilitat

3.7 MATERIALS I MÈTODES

En aquest apartat es descriuen els materials i mètodes emprats per al desenvolupament dels immunoassajos en format de micromatriu així com els experiments pel trencament de la paret bacteriana de *S. aureus*. Tots aquests experiments no es recullen en les publicacions II i III dels apartats 3.4.1 i 3.4.2, respectivament).

Reactius i immunoreactius

L'antisèrum As291, l'haptè PSau3-BSA i els pèptids PSau7 han sigut motiu d'estudi d'aquesta tesi doctoral i la seva preparació ha estat prèviament descrita (vegeu publicació III, apartat 3.4.2). Els cultius cel·lulars de *S. aureus* (CECT 5190) inactivats per calor a 100°C varen ser facilitats pel grup de Microbiologia Aplicada de la UAB (Universitat Autònoma de Barcelona) liderat pel Prof. Antoni Villaverde. Els altres reactius, com el GPTMS (ref 440167), el TRITC (ref 87918), la lisosima (ref L6875), la mutanolisin (ref M9901), el PG de *S. aureus* (ref 77140), el TFMSA (ref 158534) i la fetuïna de serum fetal bobí (ref F3004) es varen obtenir de la casa comercial Sigma-Aldrich. L'anti-IgG-TRITC (anticossos contra IgG de conill desenvolupats en cabres i units a l'isotiocianat de tetrametilrodamina; ref ab6718) es va obtenir de la casa comercial Abcam. L'Ab291-TRIC es va conjuguar al nostre laboratori seguint el protocol descrit més endavant d'aquest mateix apartat.

Tampons i dissolucions

Per a la realització de les conjugacions d'immunoreactius i els assajos de micromatriu es varen utilitzar els següents tampons:

PBS és tampó fosfat 10 mM amb una solució de NaCl 140 mM a pH 7,5. PBST és tampó PBS amb 0,05% de Tween® 20. PBT és PBST sense NaCl. Tampó d'impressió és tampó fosfat 150 mM a pH 8,5 amb 0,01% de SDS. Tampó carbonat/bicarbonat és Na₂CO₃/NaHCO₃ 0,05M a pH 9. Tots els tampons emprats pels assajos de micromatriu es varen filtrar amb un filtre de 0,45 µm per minimitzar la presència de substàncies amb possibilitat de donar enyal fluorescent.

Instrumentació i altres

Els assajos de micromatriu es varen realitzar sobre portaobjectes de vidre (Corning, NY ref 2947-75x25). Pel tapissat de les micromatrius, les proteïnes es varen dipositar sobre portaobjectes de vidre activats amb epoxisilans mitjançant un BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) en una cambra al 60% d'humitat. Les lectures de fluorescència dels portaobjectes es portaren a terme en sec amb un escàner de fluorescència, ScanArray Gx PLUS (Perkin Elmer, USA). Les corbes de calibració es varen analitzar mitjançant una equació logística de quatre

paràmetres amb el software de GraphPad Prism™ (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Les corbes estàndards es varen ajustar a una equació logística de quatre paràmetres regint-se per la fórmula: $Y = [(A-B)/1 - (x/C)^D] + B$, on A és el senyal màxim, B és el senyal mínim, C és la concentració produint el 50% del senyal màxim, i D és la pendent al punt d'infecció de la corba. En el format competitiu, la IC₅₀ i la IC₉₀ es varen calcular com a la concentració corresponent d'analit per inhibir l'assaig obtenint el 50 o 90% d'absorbància respectivament. L'assaig tipus sandvitx, és un assaig de captura i el LOD es va calcular regint-se per la fórmula: $\bar{X}_{\text{blancs}} \pm 3 \text{ SD}$. Els estudis de trencament de la paret bacteriana amb laser es varen fer amb col·laboració amb el Super-resolution Light Microscopy & Nanoscopy Lab de l'Institut de Ciències Fotòniques (ICFO) de Castelldefels emprant un làser de 1550 nm acoblat a un microscopi confocal (vegeu Figura 3.6 d). El trencament de la fetuïna bobina es va caracteritzar per MALDI-TOF/TOF-MS amb un AutoFLEX (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanya) equipat amb un laser que operava a 200-Hz. El pH dels tampons i solucions es varen mesurar amb un pH-metre 540 GLP.

Derivatització de superfícies de vidre amb epoxisilà

Les superfícies activades amb epoxisilà es varen preparar al laboratori submergint els portaobjectes en una solució de NaOH al 10% (p/w) durant 1 h a temperatura ambient, seguit de la derivatització amb GPTMS, es va afegir 1 mL de GPTMS al $\geq 98\%$ i es solapàvem les cares dels dos portaobjectes per tal de reduir al màxim la presència d'aire entre ells i es deixaven durant 1 h a temperatura ambient. Un cop els portaobjectes s'havien derivatitzat es netegeven amb EtOH al 95%, s'assecaven amb aire a pressió i es guardaven al dessecador amb buit a temperatura ambient.

Immobilització covalent de proteïnes sobre superfícies de vidre derivatitzades amb epoxisilà

L'Ag o anticòs es va immobilitzar de forma covalent a través dels grups epòxid del GPTMS mitjançant un dispensador de nanogotes (*spotter*), formant una matriu de zones micromètriques (punts o *spots*) funcionalitzades. Cada portaobjectes conté 24 matrius a l'interior de les quals es va imprimir un nombre de punts variable segons l'assaig dissenyat. La proteïna ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en tampó d'impressió) a immobilitzar es va dispensar sobre els portaobjectes activats amb grups epoxi en una cambra d'humitat controlada al 60% i 20°C. Un cop les proteïnes s'havien dispensat sobre el portaobjectes es varen deixar 3 h a temperatura ambient, si passat aquest temps els portaobjectes no es feien servir immediatament es podien guardar durant un màxim d'un mes a 4°C en un dessecador.

Purificació d'anticòs per precipitació amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

L'antiserum (550 μL) es va posar en eppendorfs i es varen mantenir en un bany de gel. A cada un es va addicionar lentament una solució saturada $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fins a

arribar al 45% (v/v) de saturació final (450 µL). Es va deixar en agitació en un bany de gel (4°C) durant 4 h. Passat aquest temps, es va observar l'aparició d'un precipitat blanc, es varen centrifugar (10000 rpm, 15 min), es varen eliminar els sobrenedants i els precipitats es varen redissoldre amb un 10-20% del volum inicial en PBS (55-110 µL). En aquest punt, els anticossos es poden dialitzar contra PBS 0,5 mM (5 x 5 L) i contra H₂O milliQ (1 x 5 L) per poder-los liofilitzar i emmagatzemar a -20°C o bé es poden seguir purificant, com va ser el nostre cas (vegeu conjugació de l'Ab291 a rodamina).

Conjugació de l'Ab291 a rodamina

El primer pas de purificació es va fer amb (NH₄)₂SO₄ al 45% seguit d'un segon grau de d'immunopurificació per proteïna A. Es varen utilitzar columnes preempaquetades de Proteïna A en safarosa (17-0402-03 HiTrap™ Protein A HP, 1 mL) convenients per a la purificació d'anticossos. Per a la purificació mitjançant proteïna A es va seguir el protocol detallat per a la mateixa casa comercial. La conjugació de l'anticòs a TRITC va tenir lloc en tampó carbonat/bicarbonat durant 2 h. Per tal d'assegurar la biofuncionalitat, es varen preparar dos bioconjugats, el conjugat 1 amb una relació molar Ab:TRITC de 1:1,8 i el conjugat 2 de 1:2,5.

Per conjuguar l'Ab291 a TRITC, es va addicionar una solució de TRITC (1 mg mL⁻¹ en DMSO, 3,2 µL pel conjugat 1 i 4,4 µL pel conjugat 2) sobre l'Ab291 (2 mg mL⁻¹ en tampó carbonat/bicarbonat, 1 mL) amb agitació constant i suau. La mescla es va deixar en agitació durant dues hores a temperatura ambient i tapat de la llum per evitar possibles degradacions del fluoròfor. Finalment els conjugats es varen purificar per diàlisi (4 x PBS 0,05 mM) i després es varen aliquotar i congelar a -20°C.

a. Càlcul de la molaritat de la proteïna

- ϵ = coeficient d'extinció molar (ex, IgG = 210000 M⁻¹ cm⁻¹)
- A_{\max} = Absorbància del fluoròfor en solució mesurada a la longitud d'ona de màxima de la molècula de fluoròfor (ex, λ_{\max} TRITC = 555 nm)
- FC = Factor de correcció, ajust per la quantitat d'absorció del fluoròfor a 280 nm (ex, TRITC = 0.34)
- Factor de dilució: Dilució aplicada. Cal aplicar dilucions per tal que les mesures d'absorbància siguin menors de 2.

$$\text{Concentració de proteïna (M)} = \frac{A_{280} - (A_{\max} \times \text{FC})}{\epsilon} \times \text{factor de dilució}$$

b. Càlcul del grau de conjugació

- ϵ' = coeficient d'extinció molar de la molècula de fluoròfor (ex, TRITC = 65000 M⁻¹ cm⁻¹)

$$\frac{\text{Mols de fluoròfor per mols de proteïna}}{\text{mols de proteïna}} = \frac{A_{\text{max}} \text{ de la proteïna marcada}}{\epsilon' \times \text{concentració de la proteïna (M)}} \times \text{factor de dilució}$$

Assaig bidimensional en format de micromatriu

En primer lloc es va immobilitzar l'antigen *PSau3*-BSA a concentracions variables d'entre d'una mateixa matriu (de 200 a 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en tampó d'impressió) tal i com es descriu en l'apartat experimental d'immobilització covalent de proteïnes sobre superfícies de vidre. Més tard, després d'una etapa de rentat amb PBST (4 x 200 $\mu\text{L pou}^{-1}$), es va afegir l'As291, variant les concentracions en les diferents matrius (dilucions de 1/50 a 1/200 en PBST, 100 $\mu\text{L pou}^{-1}$) durant 30 min a temperatura ambient. Després d'una segona etapa de rentat igual que la anterior, es va afegir la solució d'anti-IgG-TRITC (dilució 1/250 en PBST, 100 $\mu\text{L pou}^{-1}$ durant 30 min. Per finalitzar, es varen tornar a rentar els portaobjectes afegint un últim rentat addicional amb aigua purificada, a fi de minimitzar el soroll de fons en el senyal fluorescent provinent del detergent Tween® 20 i les sals. Es varen assecar els portaobjectes amb aire comprimit i es varen llegir a 543 nm amb un escàner de fluorescència.

Immunoassaig de tipus micromatriu en format indirecte competitiu per a la detecció de *PSau7*, PG i *S. aureus*

En primer lloc es va immobilitzar l'antigen *PSau3*-BSA (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en tampó d'impressió) tal i com es descriu en l'apartat experimental d'immobilització covalent de proteïnes sobre superfícies de vidre. Més tard, després d'una etapa de rentat amb PBST (4 x 200 $\mu\text{L pou}^{-1}$), es va afegir l'As291 (diluït 1/50 en PBST, 50 $\mu\text{L pou}^{-1}$) i les solucions estàndards (50 $\mu\text{L pou}^{-1}$) de *PSau7* (de 2 a 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en PBT) o PG de *S. aureus* (de 200 a 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en PBT) o *S. aureus* (de 10^9 a 0 CFU mL^{-1} en PBST) durant 30 min a temperatura ambient. Després d'una segona etapa de rentat igual que la anterior, es va afegir la solució d'anti-IgG-TRITC (dilució 1/250 en PBST, 100 $\mu\text{L pou}^{-1}$ durant 30 min. A partir d'aquí els portaobjectes es processen tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior d'assaig bidimensional, rentat final i lectura de fluorescència.

Immunoassaig de tipus micromatriu en format sandvitx per a la detecció de *S. aureus*

En primer lloc es va immobilitzar l'As291 (dilució 1/50 en tampó d'impressió) tal i com es descriu en l'apartat experimental d'immobilització covalent de proteïnes sobre superfícies de vidre. Després d'una etapa de rentat (4 x 200 $\mu\text{L pou}^{-1}$), es varen afegir les solucions estàndards de *S. aureus* (de 10^9 a 0 CFU mL^{-1} en PBT, 100 $\mu\text{L pou}^{-1}$) durant 30 min a temperatura ambient. Després d'una segona etapa de rentat igual que la anterior, es va afegir la solució d'Ab291-TRITC (dilució 1/250 en PBST,

100 mL pou⁻¹) durant 30 min. A partir d'aquí els portaobjectes es processen tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior d'assaig bidimensional, rentat final i lectura de fluorescència.

Trencament de la paret bacteriana amb làser

En col·laboració amb el Super-resolution Light Microscopy & Nanoscopy Lab de l'Institut de Ciències Fotòniques (ICFO) de Castelldefels es va emprar un làser de 1550 nm acoblat a un microscopi confocal amb el qual es varen irradiar extractes de PG (500 µg mL⁻¹ en PBS, 50 µL), suspensions de *S. aureus* (10⁹ CFU mL⁻¹ en PBS, 50 µL) i solucions estoc de PSau7 (845 µM en PBS, 50 µL) durant 10 min. Les mostres es varen posar en un portaobjectes i es varen segellar amb parafina per evitar l'evaporació o pèrdua de mostra durant la irradiació. Un cop realitzat el tractament amb el làser, es va recuperar la mostra i es varen quantificar amb l'ELISA PSau3-BSA/As291.

Trencament de la paret bacteriana amb ultrasons

Mostres d'extractes de PG (500 µg mL⁻¹ en PBS, 2 mL), *S. aureus* (10⁹ CFU mL⁻¹ en PBS, 2 mL) i PSau7 (845 µM en PBS, 2 mL) es varen sotmetre a cicles d'ultrasons (10 min x 5) amb un 40% d'amplitud.

Trencament de la paret bacteriana amb enzims

Es va afegir una solució estoc de l'enzim lisosima o mutanolisina (50 mg mL⁻¹ en PBS, 20 µL) sobre l'extractes de PG (500 µg mL⁻¹ en PBS, 1 mL), *S. aureus* (10⁹ CFU mL⁻¹ en PBS, 1 mL) i PSau7 (845 µM en PBS, 1 mL). Es deixa en agitació orbital durant 2 h a 37°C.

Deglicosilació de la fetuïna bobina

Es va afegir una mescla de anisol-TFMSA (1:2; 0,5 mL) sobre la fetuïna bobina (1 mg) en condicions d'atmosfera de nitrogen. Es va deixar temperar fins a 25°C i a continuació es va agitar durant 30 min. Passat el temps de reacció, es va procedir a neutralitzar la mostra, primer diluint amb èter etílic fred (1,5 mL) i a continuació afegint una mescla de piridina:H₂O refredada (1:1; 2,5 mL). Per últim, es varen fer extraccions amb èter etílic (2,5 mL x 3) i la fase aquosa es va dialitzar contra aigua i es va analitzar per MALDI-TOFF/TOFF-MS.

Els altres experiments posterior que es realitzaren amb el TFMSA sobre extractes de PG, suspensions de *S. aureus* i PSau7 es detallen a la publicació III (vegeu apartat 3.4.2).

Detecció de mostres amb un microscopi confocal

Amb aquest propòsit es varen preparar portaobjectes biofuncionalitzats covalentment amb l'As291 seguint el procediment explicat anteriorment per a la

immobilització covalent de preteïnes sobre superfícies de vidre derivatitzades amb epoxisilà i es va a dur a terme un assaig de tipus sandvitx (vegeu l'apartat anterior Immunoassaig de tipus micromatriu en format sandvitx per a la detecció de S. aureus d'aquest mateix apartat) però realitzant tapissant els portaobjectes dipositant gotes directament sobre el portaobjectes amb una micropietat, sense fer us del dispensador de nanogotes (spotter).

4 Establiment d'un procediment immunoquímic per a la detecció de *Pseudomonas aeruginosa* en mostres clíniques

4.1 INTRODUCCIÓ

El 1882, el bacteriòleg francès Carle Gessard va descriure les primeres soques de *P. aeruginosa* a través d'un experiment en què identificava aquest microorganisme gràcies als seus pigments solubles en aigua i al canvi de color que experimentaven els pigments en exposar-los als raigs ultraviolats¹⁴⁸. L'origen de la paraula *Pseudomonas* no està clar, ja que el significat etimològic no s'adiu amb la descripció del bacteri. Per contra, *aeruginosa* deriva del llatí i significa verdet^p, i fa referència a la coloració característica dels cultius d'aquest bacteri deguts a la producció de diversos pigments¹⁴⁹.

P. aeruginosa és l'espècie més comuna dels *pseudomonales* i és un bacil^q gramnegatiu que mesura de 0,5 a 0,8 µm per 1,5 a 3,0 µm. És aeròbic no fermentatiu, obté l'energia de l'oxidació, però en condicions extremes pot créixer anaeròbicament emprant nitrat com a acceptor d'electrons. Les condicions més favorables per al seu creixement són entre 25-37°C, però també pot sobreviure en condicions de temperatura més extremes. De fet, la seva habilitat per créixer a 42°C permet distingir-lo d'altres espècies de *Pseudomonas*. A nivell nutricional també resisteix altes concentracions de sals, tincions i alguns dels antibiòtics més comuns. Totes aquestes propietats posen de manifest la seva naturalesa ubiqua: el podem trobar en terres, aigua, plantes i animals, amb especial predilecció pels llocs humits¹⁵⁰.

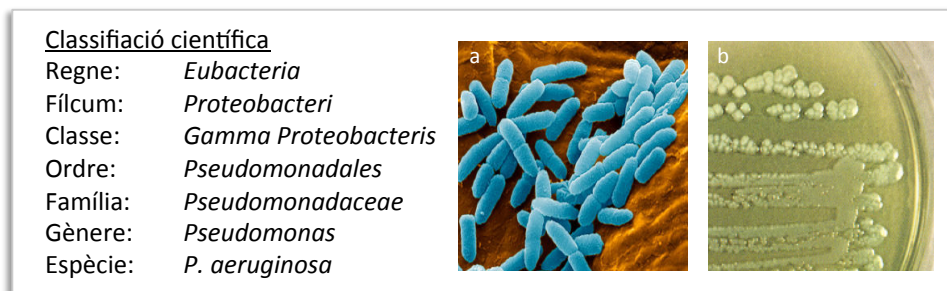


Figura 4.1 Classificació científica de l'espècie *P. aeruginosa* i imatges de l'espècie. **a)** Imatge de microscopi d'escombratge d'electrons. **b)** Colònies de *P. aeruginosa* en placa d'agar de color verd característic. Imatges reproduïdes amb permís de¹⁵⁰.

Estructuralment, segueix la constitució base dels gramnegatius, amb una paret bacteriana formada per tres capes: membrana citoplasmàtica, capa de PG (més fina

^p VERDET: Pigment que s'obté per l'acció de l'àcid acètic sobre el coure i és essencialment un acetat bàsic de coure.

^q BACIL: Bacteri que té forma de bastó.

que la dels grampositius) i membrana cel·lular externa. A més a més del LPS i diversos polisacàrids associats a la membrana externa (CPS, *Cell wall associated Polysacarides*)¹⁵¹. *P. aeruginosa* és mòbil per mitjà d'un sol flagel polar i pot viure formant biopel·lícules, de forma lliure, flotant o planctònica, forma en la qual les cèl·lules naden independentment en algun medi líquid¹⁵².

4.1.1 RELLEVÀNCIA DE *P. aeruginosa*

P. aeruginosa és un patògen oportunista^r de gran rellevància en la clínica, associat generalment a malalties nosocomials. Causa infeccions al tracte respiratori, al tracte urinari, dermatitis, infeccions del teixit tou, més una varietat d'infeccions sistèmiques^s, especialment a malalts immunodeprimits (com per exemple malalts de càncer o amb síndrome d'immunodeficiència adquirida) o víctimes de cremades greus. *P. aeruginosa* també és un patògen del regne vegetal.

L'hàbitat natural de les *P. aeruginosa* és el sòl, on conviu amb *Bacilli*, *Actinomycetes* i fongs. Per tant, de manera innata ha desenvolupat resistència a diversos antibiòtics presents en el seu medi ordinari però alhora, a base de l'exposició continuada a altres antibiòtics, també ha generat nous mecanismes per combatre'n l'efectivitat¹⁵⁰. Els mecanismes de resistència als antibiòtics poden ser específics, per una classe de droga, o generals, que afecten diferents tipus d'antibiòtics com és el cas de les bombes de sortida de flux, normalment associades a membrana i a través de la qual el bacteri pot expulsar els antibiòtics (vegeu Figura 4.2)^{153,154}.

A més, és un bacteri propens a la formació de biofilms, el quals són una eina de protecció contra els agents externs i el sistema immune. El biofilm permet al bacteri mantenir la zona d'infecció controlada i per tant augmenta encara més la dificultat d'eradicar la infecció. Una de les situacions més alarmants queda il·lustrada en pacients amb fibrosi quística (CF, *cystic fibrosis*) en què la infecció per *Pseudomonas* és en molts casos per soques resistents i la seva eradicació pràcticament impossible, com veurem en més detall a l'apartat 4.1.3.

^r OPORTUNISTA: Que afecta l'organisme quan aquest té les defenses reduïdes per una malaltia prèvia o per depauperació. Microorganismes oportunistes. Malaltia oportunista.

^s SISTÈMIC: Que afecta tot l'organisme.

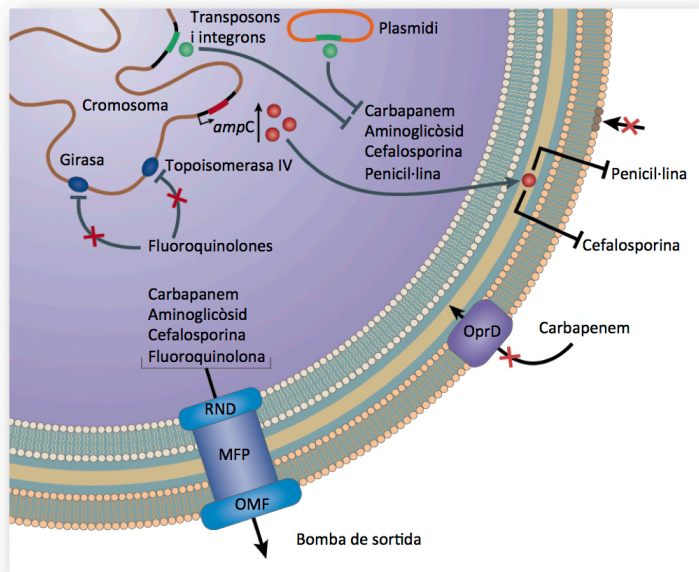


Figura 4.2 Diferents sistemes de resistència antimicrobiana¹.

4.1.2 QUORUM SENSING I PRODUCCIÓ DE PIGMENTS

Es coneix com a **Quorum Sensing** (QS) el sistema de comunicació entre cèl·lules veïnes que controla l'expressió genètica. Mitjançant l'alliberació d'exoproductes, *P. aeruginosa* i altres microorganismes estableixen una xarxa de comunicació que els permet actuar en comunitat. La composició química estructural de les molècules del QS és diversa, però s'han establert una sèrie de requisits que són els que permeten catalogar-les com a resultat del fenomen de QS:

- i) Síntesi dependent de la densitat de cèl·lules.
- ii) Són molècules de baix pes molecular reconegudes per cèl·lules adjacents.
- iii) Desencadenen una resposta de transcripció.

El bacteri *P. aeruginosa*, i més concretament les soques PA14 i PAO1, ha estat un dels models emprats per entendre en detall el funcionament del QS. La xarxa de comunicació del QS es pot explicar com una cascada de molècules de senyalització que podem classificar en tres grups segons el creixement bacterià. En un primer estadi, durant la fase exponencial del creixement, els sistemes de *quorum sensing* Las i Rhl sintetitzen lactones de *N*-acil-homoserina (AHLs, *N*-acyl-homoserine lactones o HSLs, *homoserin lactones*) com ara la lactona de la *N*-(3-oxododecanoïl)-homoserina (3-oxo-C₁₂-HSL) i la lactona de la *N*-butanoïl-homoserina (C₄-HSL) (vegeu Figura 4.3). La 3-oxo-C₁₂-HSL, a més de la funció de senyalització, actua com a determinant de virulència, modulant la resposta de defensa de l'hoste, inhibint

l'activació de les cèl·lules dendrítiques^t i de les cèl·lules T^u, induint l'apoptosis dels neutròfils^v i els macròfags^w i produint citocines inflamatòries^x. A més, el sistema Las controla l'expressió d'altres factors de virulència, com ara les elastases, les proteases LasA, les proteases alcalines o l'endotoxina A¹⁵⁵. En una fase més tardana del creixement exponencial, s'activa la segregació dels senyals quinolínics de *Pseudomonas* (PQS, *Pseudomonas quinolone signal*), essent substàncies que pertanyen a la família de les 2-aquil-4-quinolones, entre les quals la 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona anomenada PQS, ja que és el component principal d'aquest sistema de senyalització. Fins fa poc, es pensava que el PQS era el senyal terminal del QS, però estudis recents han demostrat que PQS és un dels reguladors de la síntesi dels compostos fenazínics, com ara la piocianina (PYO, *pyocyanin*)¹⁵⁶. La PYO és un dels factors de virulència de *P. aeruginosa*.

Tanmateix, moltes de les soques aïllades en pacients amb problemes respiratoris crònics presenten una mutació que inactiva el gen *LasR* (Δ LasR) i malgrat tot segueixen produint factors de virulència regulats per RhIR i PqsR. Aquest fet ha portat a investigar noves rutes i descobrir el gen *amb* (*amb genes*). En condicions normals de creixement (Figura 4.3 B), les soques mutants Δ LasR tenen una expressió baixa dels genes depenents de LasR, RhIR i PqsR, però en condicions limitades de fosfat (Figura 4.3 C), s'activa l'operó BCDE i es produeix 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehid (IQS, *2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde*) que interactua amb un factor desconegut capaç d'activar els sistemes RhIR i PqsR¹⁵⁷.

En un primer estadi de la infecció, *P. aeruginosa* actua de manera planctònica, en forma de cèl·lula individual, fent ús dels primers factors de virulència. Quan la infecció evoluciona, *P. aeruginosa* explota els sistemes d'adsorció a la superfície com ara el flagel i el pilis, produeix exopolisacàrids alginats i comença a formar biofilms. En una etapa més avançada de la infecció, *P. aeruginosa* actua en comunitat, explotant la comunicació a través del QS en la seva total complexitat. La possibilitat d'actuar en col·lectiu augmenta les garanties de supervivència de l'espècie i per tant també suposa una major adversitat per combatre les infeccions.

^t CÈL·LULES DENDRÍTIQUES: Són limfòcits que protegeixen el cos de microbis invasors, tant directament com indirectament. La seva funció principal és processar material antigènic, retornar-lo a la seva superfície i presentar-lo a les cèl·lules T del sistema immunitari.

^u CÈL·LULES T o LIMFÒCITS T: Són un tipus de limfòcit que juguen un paper central en la immunitat mediada per cèl·lules. Es distingeixen d'altres limfòcits per la presència d'un receptor de cèl·lules T (TCR, *T cell receptor*) a la superfície cel·lular. Són anomenats cèl·lules T, ja que maduren en el timus (encara que alguns també maduren a les amígdals).

^v NEUTRÒFILS: Són limfòcits de tipus granulòcit. Mesuren de 9 a 12 micres i són els leucòcits més abundants de la sang en els éssers humans. La seva funció principal és la fagocitosi de bacteris i fongs.

^w MACRÒFAGS: És una cèl·lula amb capacitat immunològica present al teixit conjuntiu.

^x CITOQUINES: Són un tipus de molècules senyalitzadores utilitzades àmpliament en la comunicació cel·lular.

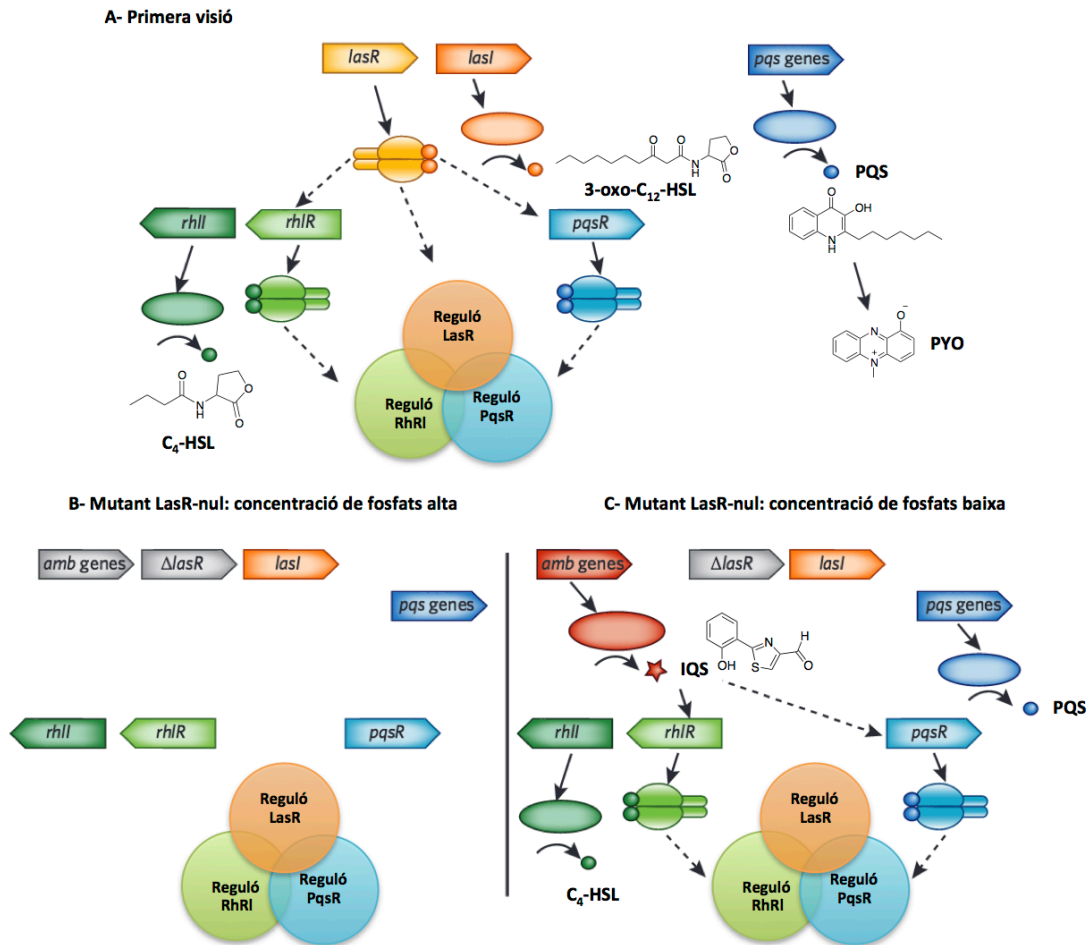


Figura 4.3 Model de molècules que participen en el QS de *P. aeruginosa*. Figura adaptada¹⁵⁷.

P. aeruginosa segrega quatre tipus de fenazines en l'etapa terminal de senyalització del QS: la piocianina (PYO, *pyocyanin*), l'àcid fenazin-1-carboxílic (PCA, *phenazine-1-carboxylic acid*), la 1-hidroxifenazina (1-OHphz, *1-hydroxyphenazine*) i la fenazin-1-carboxamida (PCN, *phanazine-1-carboxamide*). Des del punt de vista bioquímic, aquestes fenazines segregades per *P. aeruginosa* deriven de l'àcid corísmic¹⁵⁸ (vegeu Figura 4.4). La conversió de PCA a PYO passa per la codificació dels gens *phzM* i *phzS*, que codifiquen la metilació específica d'un dels nitrògens de la fenazina i la transformació de l'àcid carboxílic a un grup hidroxil, respectivament. Quan només s'expressa el *phzS* el PCA es converteix en la 1-OHphz. En aquest procés de la síntesi de fenazines, apareix un tercer gen, *phzH*, que controla la síntesi de la PCN a partir de la PCA.

Les fenazines són compostos heterocíclics que contenen nitrogen en l'anell aromàtic central. Des d'una perspectiva tecnològica-biomèdica, aquestes molècules desperten un ampli interès per les seves propietats redox i pels canvis de coloració associats al pH, les quals han permès donar-los aplicacions tan variades com són des

de cèl·lules energètiques fins a propietats antibiòtiques^{158,159}.

La **PYO** és un zwitterió format per una base fenazínica amb un grup ceto-enòlic i un grup metil al nitrogen de la posició 5 (vegeu Figura 4.4, vegeu Figura 4.7 per l'equilibri tautomèric). La PYO té un color blau característic a pH neutre, és específica de *P. aeruginosa* i possiblement per aquest motiu és la fenazina més estudiada. Està considerada un dels factors de virulència de llarga durada, i se segrega al medi en les fases estacionaries del creixement bacterià¹⁶⁰. La **1-OHphz** és de color groc ataronjat, no és específica de *P. aeruginosa*¹⁶¹ però també ha estat objectiu d'estudi per les seves propietats característiques altament semblants a la PYO. Diversos treballs evidencien els efectes negatius que ambdues molècules, PYO i/o 1-OHphz, tenen els teixits eucariòtics, tant en estudis *in vitro*¹⁶²⁻¹⁶⁴ com *in vivo*^{165,166}. Una part important d'aquesta toxicitat està relacionada amb el seu caràcter redox (potencial redox de la PYO $E_{1/2} = -247$ mV a pH 7)¹⁶⁷ i la seva facilitat per travessar les membranes cel·lulars de l'hoste. Quan creua la membrana pot oxidar els nucleòtids intracel·lulars reduïts, el dinucleòtid de nicotinamida i adenina en la seva forma reduïda (NADH, *nicotinamide adenine dinucleotide*) i el dinucleòtid fosfat de nicotinamida i adenina en la seva forma reduïda (NADPH, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), per produir anions superòxids i desencadenar espècies d'oxigen reactives¹⁶⁰.

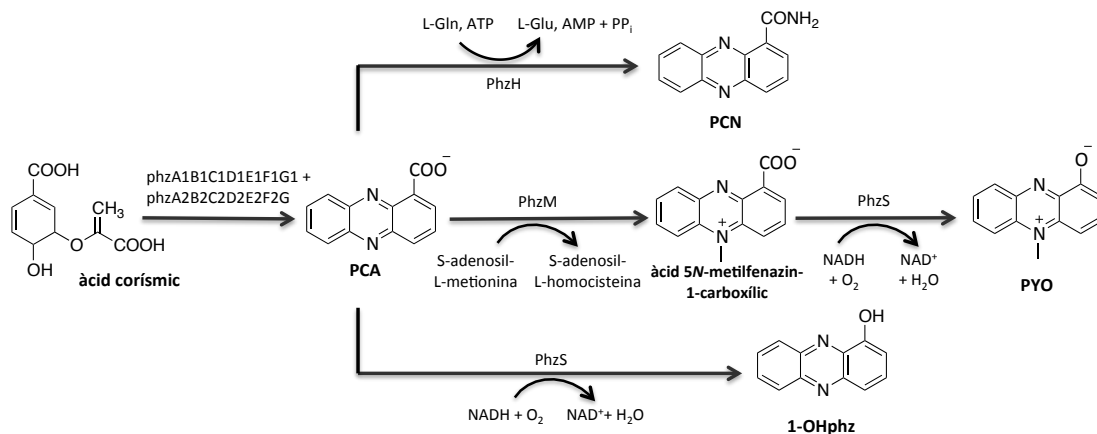


Figura 4.4 Biosíntesi de fenazines en la *P. aeruginosa*. Els gens que codifiquen les proteïnes involucrades en el procés de producció estan escrits sobre les fletxes¹⁶⁸.

A causa de l'especificitat de la PYO respecte al bacteri *P. aeruginosa*, aquest pigment s'ha emprat per realitzar diferents estudis relacionats amb infeccions produïdes pel mateix bacteri. La PYO i la 1-OHphz s'ha detectat en mostres de *P. aeruginosa* provinents de mostres de pacients¹⁶⁹ (esputs, BAS, sang, urina, secrecions nasals, recte, boca, catèters) amb concentracions que van des d'1,29 fins a 25,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A més a més, en mostres d'esput de pacients infectats amb *P. aeruginosa*, s'han detectat concentracions de fins a 100 μM ¹⁷⁰⁻¹⁷². En l'estudi de Hunter i col·laboradors¹⁷⁰, s'ha comprovat que amb l'avenç de la malaltia les concentracions

de fenazines augmenta. No obstant això, el contingut de fenazina a les vies respiratòries no es correlaciona amb la funció pulmonar del pacient.

En un estudi *in vivo*¹⁷³, on s'han inoculat *P. aeruginosa* en els pulmons d'un model de ratolí, s'ha observat que a base d'estar exposats a concentracions cròniques de PYO, els ratolins han desenvolupat patologies semblants a les dels pulmons fibrosos i d'aquí s'extrapola que la PYO accelera la disfunció dels pulmons d'aquests pacients. Altres treballs apunten a la detecció de la PYO com a un bon predictor dels períodes d'exacerbació¹⁷⁴.

La població de *P. aeruginosa* dels pacients infectats crònicament amb CF presenta una alta diversitat fenotípica¹⁷⁵, fet que implica una variació en la capacitat productora de PYO de cadascuna d'aquestes soques¹⁷⁶. Estudis del centre de CF de Liverpool evidencien la presència de soques de *P. aeruginosa* hípervirulentes amb una disfunció d'un fenotip del QS que es tradueix en una sobreproducció d'alguns dels productes resultants del QS¹⁷⁷, com ara la PYO i les proteases LasA. Aquestes soques es coneixen com a soques epidèmiques de Liverpool (LES, *Liverpool Epidemic Strain*)¹⁷⁸ però, tot i el seu nom, les LES també s'han detectat en altres regions com ara el Regne Unit i Canadà¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Aquestes soques estan associades a un augment de la resistivitat als antibiòtics i, per tant, a un pitjor pronòstic de la infecció¹⁸², especialment per als malalts de CF, als quals s'associa un major risc de mortalitat i un increment de la necessitat de transplantament de pulmó¹⁷⁹.

Tot i els estudis, la diversitat de dades obtingudes, la complexitat del tema i la manca de models *in vivo* adequats, dificulta extreure conclusions sobre la viabilitat de la PYO com a biomarcador d'infeccions causades per *P. aeruginosa*. Els estudis *in vivo* s'han fet en condicions de normoxia^y, un model no idoni si tenim en compte que les vies aèries dels pacients amb CF estan privats del suplement normal d'oxigen (condicions d'hipòxia^z).

P. aeruginosa també produeix altres pigments, com ara la **piomelanina**, de color marró clar, i la **piorubina**, de color vermell-marronós^{183,184}, ambdós no específics de l'espècie. També segrega els sideròfors^{aa} **pioverdina**, un pigment fluorescent de color groc-verdós¹⁸⁵ característic de *Pseudomonas* que intervé en la captació de ferro, i **piocelina**, amb menys afinitat per captar el ferro que la pioverdina¹⁸⁶. La **pioverdina**^{187,188} té una estructura mixta composta per una part peptídica i un

^y NORMÒXIC: Condicions de concentració normal d'oxigen, 20-21% en atmosfera i un 2-3% en contextos fisiològics.

^z HIPÒXID: Condicions en què els teixits estan privats de suplement d'oxigen normal.

^{aa} SIDERÒFOR: És un compost amb capacitat quelant de ferro segregat per microorganismes. Del grec, transportador de ferro.

cromòfor^{bb}. L'estructura del cromòfor és un derivat de quinolona, àcid (1S)-5-amino-2,3-dihidro-8,9-dihidroxi-1*H*-pirimido[1,2-*a*]quinolina-1-carboxílic, es conserva entre les espècies analitzades, mentre que la part peptídica varia entre espècies i fins i tot entre clons d'una mateixa espècie (vegeu Figura 4.5). Actualment s'han descrit fins a 50 pioverdines diferents en base a la seva estructura peptídica^{185,187}, que pot contenir entre 6 i 12 aminoàcids. Entre les soques de *P. aeruginosa*, s'han distingit tres tipus de pioverdines, que difereixen en la composició de l'estructura peptídica¹⁸⁸. La pioverdina no només actua com a sideròfor, sinó que també està involucrada en la producció de factors extracel·lulars de virulència (proteasa PrpL o exotoxina A) i, de fet, s'ha vist que és essencial tant per a l'establiment d'infeccions greus com per a la producció de biofilms^{189,190}. La pioverdina s'ha detectat en mostres d'esput de malalts amb infeccions cròniques, i mitjançant els estudis dels diferents tipus de pioverdina aïllats en mostres d'esput de malalts amb CF s'ha pogut concloure que un pacient de CF està infectat per una única soca de *P. aeruginosa*¹⁸³.

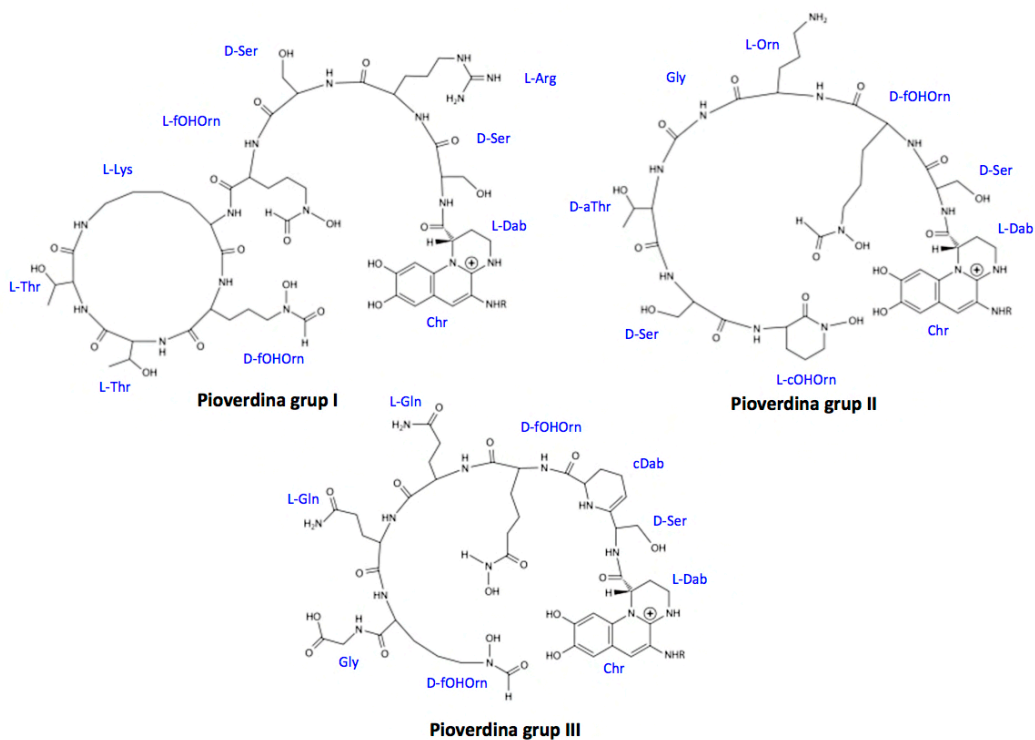


Figura 4.5 Estructures dels tres tipus de pioverdines (PVD) en *P. aeruginosa*: PVD grup I, PVD grup II i PVD grup III. aThr, alo-teronina; cDab, anell de tetrahidropirimidina generat per la condensació de Dab amb el grup amino precedent; Chr, crom. Imatges reproduïdes amb permís de ¹⁹¹

^{bb} CROMÒFOR: Agrupació atòmica insaturada d'una molècula o cromogen que absorbeix radiació visible o ultraviolada.

La **piocelina** es produeix en totes les espècies de *P. aeruginosa* aïllades. La seva estructura, formada per tres heterocicles, dues tiazolines i una tiazolidina, és una estructura química no habitual entre els sideròfors¹⁹², generalment compostos de quel·ladors del ferro com ara catecolats i hidroxamats, com és el cas de la pioverdina. Per la seva menor afinitat amb el ferro en comparació amb la pioverdina, s'ha demostrat que en un primer estadi la *P. aeruginosa* produeix piocelina i quan la concentració de ferro és extremadament baixa aleshores produeix pioverdina.

4.1.3 FIBROSI QUÍSTICA

La fibrosi quística (CF, *cystic fibrosis*) és una malaltia genètica hereditària que afecta principalment els pulmons, alterant els conductes transmembrana reguladors de la fibrosi quística (CFTR, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), i provoca un dèficit en el transport de ions clorur i secrecions de bicarbonat, així com també una excessiva adsorció d'aigua, fet que provoca una deshidratació dels líquid que cobreix la barrera epitelial^{170,193}. Com a conseqüència d'aquesta disfunció, hi ha una acumulació de moc espès als pulmons que afavoreix la captura de bacteris en les vies de secreció.

En les primeres catalogacions de la CF, la malaltia es va associar principalment a les colonitzacions per *S. aureus*. Més tard, al voltant del 1950, *P. aeruginosa* va ser reconegut com un patogen important en la CF. Actualment les bacteries que són comunament més patogèniques pels malalts de CF inclouen *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* i espècies del gènere *Burkholderia*¹⁹⁴.

A Espanya, unes 2.700 persones pateixen aquest trastorn, xifra que suposa un 0,00682% de la població. L'esperança de vida dels pacients amb CF ha millorat significativament en els darrers anys¹⁹⁵ com a resultat de la major efectivitat dels tractaments; tanmateix aquests tenen una vida mitjana al voltant del 20 anys¹⁹⁶. Les noves teràpies han permès eradicar infeccions de *P. aeruginosa* en els pacients joves de CF, però *P. aeruginosa* segueix sent crònica en la majoria de pacients de CF majors i la seva eradicació és pràcticament impossible¹⁹⁴.

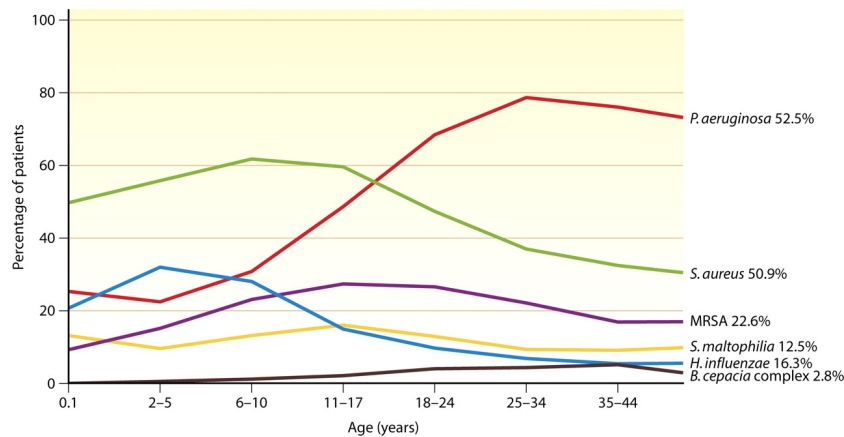


Figura 4.6 Prevalències de diversos patògens respiratoris comuns en la CF en funció de l'edat¹⁹⁷.

4.1.4 ANTICOSSOS CONTRA *P. aeruginosa*

De manera similar a l'apartat homòleg per a *S. aureus* (apartat 3.1.4), la majoria dels anticossos disponibles contra *P. aeruginosa* estan basats en la utilització del conjunt bacterià, possiblement un extracte, com a immunogen. Cases comercials com ara Abcam, Thermo Scientific i Santa Cruz Biotechnology ofereixen una gran varietat d'anticossos d'aquest estil. Les diferències entre aquests immunògens rau en la soca de *P. aeruginosa* i el tractament que s'ha fet al bacteri, si s'escau. Altres estratègies es basen en la producció d'anticossos a partir d'extractes d'antígens del bacteri. Segons l'origen, els podem classificar en exoproductes, capa extracel·lular, paret cel·lular o externs de la membrana.

Dintre dels exoproductes, trobem tots els factors de virulència excretats pel bacteri. Alguns exemples contra els quals s'han produït anticossos són: l'exotoxina A, l'exoenzima S, la fosfatasa alcalina, l'elastasa, l'hemolisina i la fosfolipasa C^{198,199}. L'exotoxina A és un dels exemples més estudiats per a la producció d'anticossos. És una toxina molt immunogènica i els toxoides^{cc} que s'han preparat han demostrat produir un títol d'anticòs alt i específic^{198,200}. Per altra banda, també s'ha observat que un mAb produït contra la toxina extreta de la soca PA103 no reconeixia la exotoxina purificada de les soques PA0-PR1 i PA01, fet que suggereix l'existència de diferències estructurals entre soques²⁰¹.

La capa extracel·lular que envolta la paret cel·lular està formada majoritàriament per l'alginat, un polímer lineal que alterna unitats d'àcid D-mannurònic i el seu

^{cc} TOXOIDE: Toxina que per l'acció del formol i de la temperatura ha perdut les propietats tòxiques, però que conserva les propietats antigèniques, la qual cosa permet utilitzar-la per a la vacunació antitòxica.

epímer^{dd} C-5, l'àcid L-gulurònic. En alguns estudis, s'ha identificat IgA i IgG anti-alginat en secrecions nasals de pacients amb sinusitis²⁰². La detecció s'ha fet mitjançant ELISA utilitzant com a Ag de tapissat extractes d'alginat, i s'ha pogut comprovar com augmenta la producció de IgA en el sinus quan la zona està infectada *P. aeruginosa*. Un altre treball descriu la producció d'un mAb contra alginat. S'ha descrit la producció d'un mAb dirigit contra els epítops d'àcid D-mannurònic de la molècula d'alginat²⁰³. L'anticòs s'ha obtingut a partir de la immunització amb alginat purificat, s'ha evaluat l'especificitat de l'epítop per ELISA i posteriorment en assajos *in vivo* com a possible reactiu terapèutic en infeccions de *P. aeruginosa*.

L'accessibilitat de la paret cel·lular ha fet que els seus antígens també fossin atractius per a la producció d'anticossos. El LPS està format per tres regions, l'Ag O (també anomenat PS O-específic), el nucli d'oligosacàrids i el lípid A. La diversitat química dels Ags O de *P. aeruginosa* (més de 20 serotips majoritaris) més la baixa immunogenicitat dels principals epítops ha fet que aquesta fos una via explorada, principalment per a la producció d'anticossos terapèutics, amb l'obtenció de resultats encoratjadors però no suficientment per implementar-se en l'àmbit clínic²⁰⁴. De Kievit *et al.*, descriuen la producció de diferents mAb a partir d'extractes de diferents parts de la paret. Entre els clons obtinguts, alguns específics per a diferents parts del LPS, com ara el mAb 177 específic del lípid A o el mAb101 amb major afinitat pel nucli d'oligosacàrids²⁰⁵. Els mAb s'han avaluat per ELISA però no s'han implementat per a la detecció de *P. aeruginosa*.

Per altra banda, a partir d'estudis serològics, s'ha vist que els bioreceptors dels components extracel·lulars, com el flagel o el pilus o antígens del citoplasma com ara els ribosomes, estimulen el sistema immunitari i generen anticossos contra aquests antígens¹⁹⁸. Tanmateix, no hem trobat treballs on s'hagi descrit com obtenir els immunògens per a la producció d'anticossos contra aquests antígens.

Més recentment, altres estudis han apuntat al desenvolupament d'anticossos contra les molècules del QS de *P. aeruginosa*, les HSL (vegeu apartat 4.1.2). Per les característiques d'aquestes molècules quant al baix pes molecular i la inestabilitat hidrolítica, el sistema immune dels pacients infectats per *P. aeruginosa* no genera anticossos contra aquestes molècules²⁰⁶. Els primers treballs en aquesta línia els va iniciar el grup del Prof. Janda amb la producció de l'anticòs RS2-1G9²⁰⁷, sintetitzant un haptè d'immunització anàleg a la 3-oxo-HSL. Més recentment, s'ha descrit la producció d'altres anticossos monoclonals contra les homoseril lactones²⁰⁸. Amb aquests segons anticossos s'ha desenvolupat un ELISA en format competitiu amb

^{dd} EPÍMER: Diastereòmers que es diferencien en la configuració d'un únic centre estereogènic.

una IC₅₀ de 4 nM en PBS i 10 nM en orina. Erickson *et al.*, reporta la detecció de extractable 3-oxo-C₁₂-HSL i C₄-HSL en espunts de pacients amb CF en el rang del nanomolar (fins a 22 nM per la 3-oxo-C₁₂-HSL i entre 0 i 5 nM per la C₄-HSL)²⁰⁹. Tanmateix, es creu que aquests valors poden variar àmpliament en funció de les soques i per tant és necessari l'estudi més acurat per obtenir valor concloents²⁰⁸.

4.1.5 APROXIMACIONS IMMUNOQUÍMIQUES PER AL DIAGNÒSTIC D'INFECCIONS CAUSADES PER *P. aeruginosa*

La serologia, detecció dels anticossos contra *P. aeruginosa* presents en el sèrum, és una de les tècniques de diagnòstic que s'han explorat. L'ELISA és el mètode principal que s'utilitza per a la detecció dels anticossos en sang, seguit de la immunoelectroforesi i els radio immunoassajos¹⁹⁹. Els antígens, de més a menys utilitzats, són l'exotoxina A, l'elastasa, l'antígen estandard (St-Ag:1-17), la fosfatasa alcalina i el LPS. En general, l'increment dels títols d'anticòs està associat a una infecció persistent, però no sempre s'observa una diferència clara entre els nivells d'anticòs en pacients infectats i pacients control²¹⁰. Per tant, l'ús d'aquestes tècniques com a eina de diagnòstic d'infecció com s'ha comentat anteriorment, es posa en dubte, ja que requereixen ser contrastades amb el cultiu de les mostres per poder confirmar la persistència o no d'infecció¹⁹⁹. La falta d'especificitat del mètode podria venir donada per un mal disseny dels antígens que s'utilitzen. Tot i la falta d'especificitat de la tècnica, la serologia és una alternativa al cultiu d'esput, que és la tècnica més habitual amb què es detecten els bacteris associats a problemes respiratoris, però a vegades l'obtenció d'aquestes mostres és complicada i requereix la introducció de catèters.

Moltes cases comercials també ofereixen kits per a la detecció de IgG humana contra Ags de *P. aeruginosa*, com per exemple Mediagnost® (Reutlingen, Germany) amb kits per a la detecció de la fosfatasa alcalina, l'exotoxina A o l'elastasa en sèrum i plasma. SSI Diagnostica (Copenaguen, Dinamarca) n'és un altre exemple amb un kit que com a tapissat de la placa d'ELISA utilitza una barreja d'Ags dels serotips^{ee} O-1 i O-17 de *P. aeruginosa*, i una barreja d'anticossos contra *P. aeruginosa* com a sèrum estàndard.

Pel que fa al desenvolupament d'assajos immunoquímics per a la detecció de *P. aeruginosa* l'ELISA és una de les opcions més comunes, com el multiplexat per a la detecció simultània de la fosfatasa alcalina, l'elastasa i l'exotoxina A, amb límits de

^{ee} SEROTIP: Subdivisió d'una espècie o d'una subespècie de microorganismes que inclou organismes que tenen algun caràcter antigènic comú que els diferencia d'altres línies o soques.

detecció de 18 pg mL⁻¹, 34 pg mL⁻¹ i 22 pg mL⁻¹, respectivament²¹¹. Els anticossos utilitzats són policlonals que han estat obtinguts a partir de la immunització d'extractes de les mateixes proteïnes, en el cas de l'elastasa i l'exotoxina prèviament convertides en toxoides. L'estudi de reactivitat creuada que es mostra és incomplet, ja que només s'avalua enfront de les tres exotoxines de l'assaig però amb el disseny d'immunogen emprat és altament possible que els assajos cros reaccionin amb l'elastasa i la fosfatasa alcalina d'altres organismes, ja que només l'exotoxina A és específica de l'espècie *P. aeruginosa*. L'assaig tampoc no ha estat implementat en mostres biològiques.

Un altre treball descriu un immunoassaig per a la detecció directa del bacteri, mitjançant la detecció de l'anticòs no lligat a la bacteria amb un anti-IgG marcada amb el fluoròfor Cy5¹³⁰, que assoleix un LOD de 4,10·10⁶ CFU mL⁻¹. Mentre que l'assaig és ràpid, 15 min, els anticossos emprats són comercials contra un Ag de la paret bacteriana del qual no s'especifica quin ha estat l'antigen per generar-los. No s'han fet estudis de reactivitat creuada ni s'ha implementat a mostres reals.

Altres aproximacions apunten a la immobilització dels anticossos en plataformes sensores miniaturitzades. Bekir i col·laboradors han desenvolupat un sensor impedimètri²¹² en el qual els anticossos de captura, anti-*P. aeruginosa*, s'han immobilitzat sobre elèctrodes de carbó. L'assaig s'ha aplicat a l'anàlisi de mostres d'aigua, i tot i la bona detectabilitat, fins a 10¹ CFU mL⁻¹, se'n desconeix l'antigen de reconeixement dels anticossos; són comercials i no se'n donen detalls.

De nou, ens trobem davant d'un escenari amb diversos mètodes desenvolupats però amb la carència d'un mètode competent per substituir els actuals mètodes rutinaris.

4.1.6 TREBALLS ANTERIORS PER A LA DETERMINACIÓ DE LA PIOCIANINA

La recerca i els resultats descrits més endavant constitueixen el primer treball adreçat a la detecció del pigment piocianina mitjançant tècniques immunoquímiques. Anteriorment, s'han descrit altres tècniques no específiques per a la mesura quantitativa i/o qualitativa del pigment PYO (vegeu Taula 4.1).

Les primeres quantificacions del pigment piocianina es van fer per absorbància aprofitant els màxims d'absorció característics de la molècula. La PYO és sensible al pH, del qual deriven canvis en la coloració del pigment i també en l'espectre d'absorbància¹⁶⁰. S'han descrit protocols per extreure el pigment dels medis cultiu o matrius biològiques per poder quantificar el pigment¹⁷⁸.

El 1986 Watson i col·laboradors van establir un mètode per analitzar els pigments PYO i 1-OHphz mitjançant Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)²¹³. Aquest és el mètode més acurat per a la quantificació. Tot i els desavantatges que presenta l'HPLC a l'hora d'analitzar matrius biològiques, s'han descrit protocols on han estat capaços de detectar els pigments en mostres d'esput de pacients infectats. Detectant concentracions de piocianina de l'ordre de $\mu\text{g mL}^{-1}$ en esput¹⁷². Pel que fa al sistema de detecció, s'ha fet emprant espectroscòpia d'ultravioleta-visible (UV-vis, *Ultraviolet-visible spectroscopy*) o per espectrometria de masses (MS, *mass spectrometry*) (vegeu Taula 4.1). Per UV-vis és necessari monitoritzar les absorbàncies de les diferents fenazines i conèixer el perfil de cadascuna d'elles, mentre que els detectors de masses són mètodes inequívocs que permeten conèixer la masses exacte del producte. Quant a les detectabilitats, els mètodes de MS també permeten millorar la sensibilitat. Mentre que amb MS utilitzant la monitorització d'un sol ió (SIM, *single-ion-monitoring*) s'arriben a detectabilitats del nM, amb els mètodes de UV-vis la detectabilitat reportada per les fenazines és de l'ordre del μM .

Taula 4.1 Tècniques per a la detecció de piocianina.

Tècnica	Analit	Matriu	LOD	Observacions	Ref
Abs	PYO	Medi cultiu	-	No s'ha establert un mètode quantitatiu	178,214
GC	PYO	Medi cultiu	10 pg	Inapropiada per a mostres complexes	213
HPLC-UV-vis. + GC	PYO	Esput	5-10 ng	Tot i la complexitat de la tècnica, simplifica les dificultats d'anàlisi respecte l'ús de GC simple	213
HPLC-MS	PYO 1-OHphz	Esput Esput	952 nM 505 nM	Les concentracions s'han calculat a partir de l'anàlisi UV	172
VP	PYO	Medi cultiu	rang nM	Senyal inespecífic	215
VP	PYO	Tampó	30 nM	Senyal inespecífic	216
VP	PYO	Medi cultiu Urina Esput BAL Sang*	0,18 μM 1,81 μM 0,13 μM 0,14 μM 0,16 μM	Senyal inespecífic	171
VP+UV-vis.	1-OHphz	Tampó	0,48 μM	Senyal inespecífic	217
Raman	PYO	Tampó esput	23,8 nM 23,8 nM	Senyal inespecífic	218

GC: Cromatografia de gasos (*gas chromatography*). Abs: Absorbància. VP: Voltamperometria. *Sang amb heparina.

Més tard han aparegut tècniques electroanalítiques per a la detecció de la PYO tant en tampó com en matriu amb límits de detecció significativament prometedores, com la voltamperometria amb un LOD de l'ordre del nM²¹⁵ o un sensor de

voltamperometria sobre fibra de carbó amb un LOD de 0,030 μM ²¹⁶. El fonament d'ambdós mètodes es basa en les propietats redox de la PYO, fet que els fa no completament específics ja que altres espècies redox reactives presents en el medi també podrien generar senyals. Recentment, s'ha publicat un sistema de detecció òptica, concretament basat en espectroscòpia raman on també s'assoleixen LOD de l'ordre de 2,38 nM en tampó i esput però, de nou, aquest sistema tampoc disposa d'un receptor específic²¹⁸.

4.2 OBJECTIU I ESTRATÈGIA

L'objectiu d'aquest capítol 4 era donar solució a l'actual manca de sistemes de detecció de *P. aeruginosa* que es puguin implementar de manera fàcil en els hospitals, que siguin específics pel microorganisme en qüestió i els resultats s'obtinguin en temps breu de manera que permetin prescriure els antibiòtics més adequats segons la infecció. Amb un plantejament semblant al del capítol 3, cadascun amb els respectius microorganismes, es va proposar la tècnica d'ELISA per donar solució a aquest problema. Per assolir aquest objectiu, ens vam proposar els següents objectius específics.

4.2.1 SELECCIÓ DE LA DIANA I PREPARACIÓ DELS IMMUNOREACTIUS

El pigment piocianina (PYO) present en la major part de les soques de *P. aeruginosa* i específic del bacteri es va seleccionar com a diana per a la detecció de *P. aeruginosa*. A causa del baix pes molecular de la PYO, era necessària la producció d'un haptè d'immunització per posteriorment poder-ne obtenir els anticossos corresponents.

En una primera instància, es va abordar el disseny d'haptens d'immunització contra la PYO. Tots aquests treballs es discuteixen en l'aparat 4.3.1 i els detalls experimentals es detallen a l'apartat 4.6. Posteriorment, la segona aproximació va anar dirigida a la síntesi d'un haptè d'immunització contra la 1-OHphz. El disseny i síntesi d'aquest haptè (haptè PC1) es recull en la publicació IX (patent; vegeu apartat 4.3.5) i la publicació X (article; vegeu apartat 4.3.6).

4.2.2 PRODUCCIÓ I AVALUACIÓ DELS ANTICOSSOS ESPECÍFICS

L'haptè d'immunització PC1 es va conjuguar a una biomacromolècula capaç d'estimular el sistema immunològic de l'hoste i es va immunitzar per triplicat a conills blancs de varietat New Zealand. Un cop acabat el procés d'immunització, els antisèrums (As230, As231 i As232) es van avaluar per ELISA. Tots els detalls de la producció dels anticossos i la seva avaluació es recullen en la publicació X (vegeu apartat 3.4.1) i en la publicació IX (vegeu apartat 3.4.2).

4.2.3 DESENVOLUPAMENT I AVALUACIÓ D'UN ELISA EN FORMAT DE MICROPLACA PER A LA DETECCIÓ DE PYO I 1-OHPHZ

A continuació, els anticossos es van implementar en un assaig de tipus ELISA en format de microplaca que permetés quantificar ambdós pigments, la PYO i la 1-OHphz. Per tal d'assolir aquest objectiu, primer es va estudiar la conversió de la PYO a 1-OHphz per mètodes cromatogràfics. En segon lloc, es va dissenyar un protocol immunoquímic que permetés quantificar la 1-OHphz i la PYO emprant anticossos contra la 1-OHphz. I en tercer lloc, es va establir un assaig immunoquímic per a la detecció dels pigments. Un cop establert l'immunoassaig, es van estudiar els paràmetres fisicoquímics de l'assaig (pH, força iònica, tant per cent Tween® 20, temps de competència i temps preincubació de l'anàlit amb l'anticòs). Aquests treballs es recullen de manera detallada en la publicació X (vegeu apartat 3.4.1) i en la publicació IX (vegeu apartat 3.4.2).

Finalment, l'assaig es va implementar per a la quantificació dels pigments en mostres de cultius cel·lulars de *P. aeruginosa* i més tard en mostres d'origen biològic (esput). Els detalls dels treballs en cultius cel·lulars de *P. aeruginosa* no han estat publicats i es recullen en l'apartat 4.3.3. La implementació en les mostres biològiques s'inclou en la publicació X (vegeu apartat 3.4.1) i la publicació III (vegeu apartat 3.4.2).

4.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.3.1 DESENVOLUPAMENT D'ANTICOSSOS ESPECÍFICS PER A LA DETECCIÓ DE P. AERUGINOSA

La PYO, arran del seu baix pes molecular, presenta una baixa immunogenicitat, per la qual cosa seria metabolitzada i posteriorment excretada amb facilitat per l'hoste

escollit per produir anticossos¹⁷². Per aquest motiu, és necessari el disseny d'un haptè d'immunització que permet introduir un braç espaiador a la molècula i conjugarla a una biomacromolècula d'alt pes molecular capaç d'estimular la producció d'anticossos. La Figura 4.7 mostra l'estructura química dels tres haptens de piocianina proposats per a la preparació d'immunoreactius. Les fletxes indiquen la posició en què s'introduiria el braç espaiador per introduir una modificació de l'estructura química de l'anàlit.

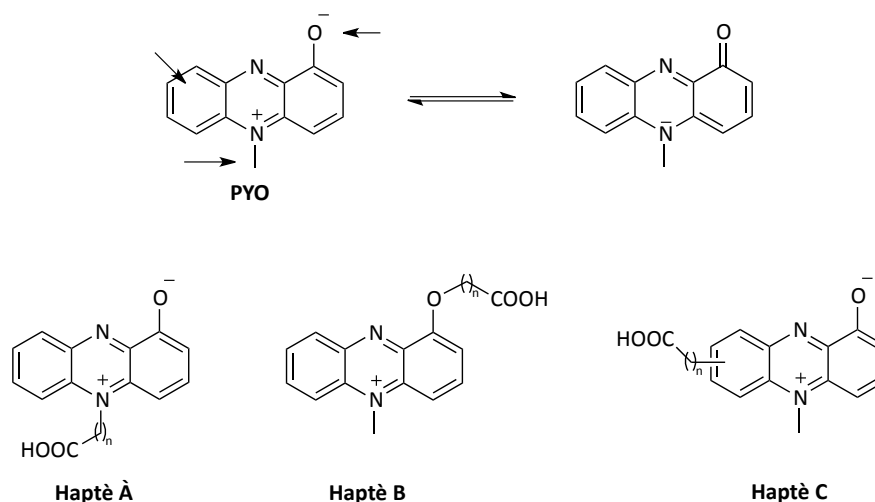


Figura 4.7 Estructura química dels tres haptens de PYO proposats per a la preparació d'immunoreactius. Les fletxes indiquen la posició en què s'introdueix la modificació de l'estructura química de l'anàlit.

a Preparació dels haptens A i B

A partir de l'estratègia sintètica de la PYO publicada per Surrey i col·laboradors²¹⁹ es van proposar els esquemes retrosintètics que es mostren a la Figura 4.8 per a la preparació dels haptens A i B.

El 1,2-dihidroxibenzè-3-metoxi (1) es va proposar com a compost de partida per la síntesi dels dos haptens. Després d'una oxidació dels grups hidroxils per formar la quinona, aquesta es condensaria amb el 1,2-diaminobenzè (3) per a l'obtenció de la metoxifenazina (4). Una desprotecció del grup metoxi permetria obtenir la 1-OHphz (5). A continuació, s'introduiria el braç espaiador mitjançant una reacció d'atac nucleòfil del N-5 de la hidroxifenazina (5) sobre un èster alquínic halogenat. Finalment, la hidròlisi de l'èster portaria a l'obtenció de l'haptè A (6). L'haptè B es prepararia a partir de la 1-OHphz (5), introduint un braç espaiador mitjançant una reacció de substitució nucleòfila entre un èster alquínic halogenat i el grup fenòxid generat en medi. Seguidament, es procediria a hidrolitzar l'èster metílic per obtenir l'haptè B (8). Així mateix, la 1-OHphz (5) constitueix un intermedi clau també per a l'obtenció de la PYO.

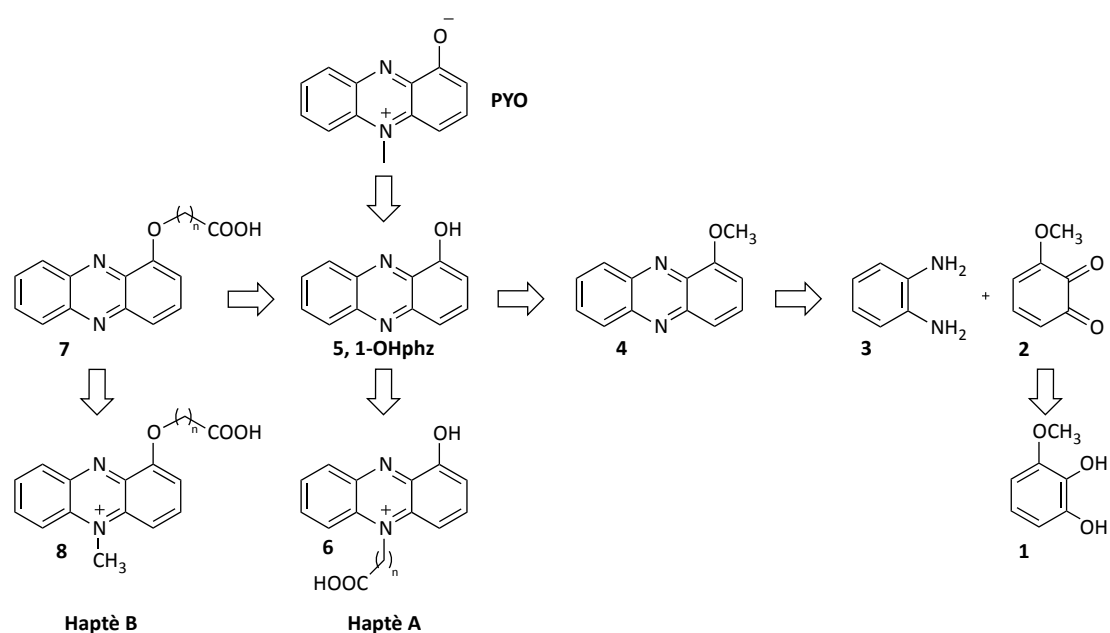


Figura 4.8 Anàlisi retrosintètica per a la preparació dels haptens A i B i síntesi de la PYO.

a.1 Preparació de la 1-hidroxifenazina (5)

L'oxidació dels dos hidroxils del 1,2-dihidroxí-3-metoxibenzè (1) (vegeu Figura 4.9) es va assajar inicialment amb PbO_2 seguint el procediment descrit per Surrey²¹⁹, tanmateix la reacció no va tenir lloc. En una primera instància, es va atribuir a la puresa del PbO_2 , i per aquest motiu es va assajar amb un segon PbO_2 de màxima puresa (99%), el treball dels autors no especificava la puresa del seu reactiu, però aquest segon intent tampoc va tenir èxit. En conseqüència, es va assumir a la diferència d'escala de treball, Surrey utilitzava una escala elevada i treballava emprant reactors químics. Es va assajar una alternativa, seguint el procediment emprat per Carlson i Miller²²⁰, en el qual el PbO_2 era substituït per la 3,4,5,6-tetracloro-1,2-benzoquinona (9) i s'obtenia així un rendiment del 75% en l'obtenció de la 3-metoxi-*o*-benzoquinona (2). Seguidament, la condensació entre la *o*-quinona (2) i el 1,2-diaminobenzè (3) comercial va permetre obtenir la 1-metoxifenazina (4) tal com es desprèn dels senyals de NMR ^1H , desplaçament del grup metoxi respecte del reactiu de partida i formació de nous protons aromàtics. Tal com descrivia Surrey²¹⁹ la reacció es va dur a terme en medi àcid per millorar la solubilitat del diaminobenzè (3) (vegeu Figura 4.9). Va ser precís purificar el cru de reacció per columna de cromatografia de sílice per eliminar els polímers de quinona formats en el medi de reacció, cosa que va permetre aïllar la metoxifenazina (4) amb un rendiment del 41%.

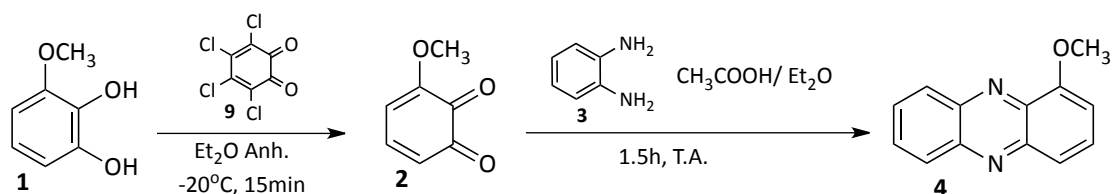


Figura 4.9 Condensació de la *o*-quinona (2) amb el diaminobenzè (3) per obtenir la metoxifenazina (4).

La següent etapa va consistir en la desmetilació de la metoxifenazina (4) per a l'obtenció de la 1-OHphz (5). De la mateixa manera que la reacció anterior, aquesta etapa havia estat descrita per Surrey²¹⁹ emprant HBr com a agent desmetilant. Seguint aquest procediment s'obtingué un rendiment del 22%. Amb la finalitat de millorar aquest rendiment, es va assajar de nou la reacció emprant com a agent desmetilant el BBr_3 ²²¹. Aquest últim reactiu va permetre obtenir el compost (5) amb un rendiment de fins el 36% amb un rendiment global de la síntesi per a l'obtenció de la 1-OHphz (5) del 16%.

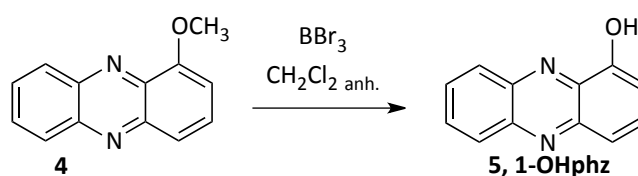


Figura 4.10 Obtenció del 1-hidroxifenazina (5) a partir de la 1-metoxifenazina (4)

Com a conseqüència del baix rendiment es va assajar un procediment alternatiu basat en el treball de Donald i col·laboradors²²² utilitzant la fenazina (10) com a producte de partida (vegeu Figura 4.11) per introduir el metil a la posició 5 i posteriorment el grup hidroxil a la posició 1. La metilació d'un dels nitrògens es va dur a terme amb $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, emprant un excés de 2,7 equivalents de l'agent metilant respecte de la fenazina i PhNO_2 com a dissolvent, i es va obtenir el producte desitjat amb un rendiment del 70%. A continuació, es va procedir a la introducció del grup hidroxil en el carboni 1 del sistema aromàtic, es preparà una dissolució 4 mM del metansulfonat de *N*-metilfenazina (11) en H_2O i es deixà la dissolució durant 24 h exposada a la llum solar. La formació del compost (12) es va controlar mitjançant cromatografia de capa fina (TLC, *thin-layer chromatography*) en observar l'aparició d'una taca de color blau cian. Sense aïllar el producte, es va basificar la solució afegint NaOH 8 M (5 mL) durant 16 h per procedir a la desmetilació del compost (12), cosa que va permetre obtenir la 1-OHphz (5) amb un rendiment del 72%, amb un rendiment global del 50%, significativament superior al de la primera estratègia assajada (16%).

La 1-OHphz (5) es caracteritza pel seu color groc i per l'aparició de dos doblets a la zona aromàtica a δ 7,20, 7,69 i 7,78 més tres multiplets també en la zona aromàtica en l'espectre de NMR ^1H (vegeu detalls a l'apartat de materials i mètodes 4.6).

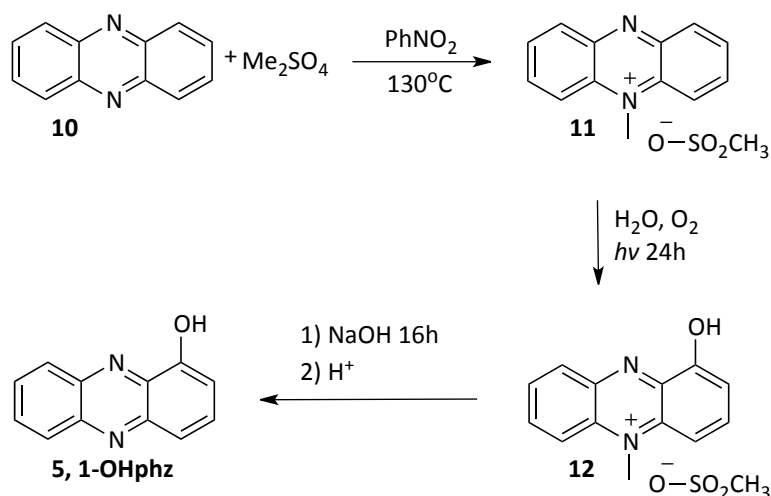


Figura 4.11 Esquema alternatiu per a la síntesi de 1-OHphz (5) a partir de la fenazina (10).

a.2 Reacció de 5N-alquilació per a l'obtenció de piocianina.

A partir de la fenazina (5) es va procedir a la 5N-metilació d'aquest compost amb la finalitat d'obtenir la piocianina. Novament, es va seguir el procediment descrit per Surrey²¹⁹ que s'utilitzava $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ en excés com a agent metilant i dissolvent de la reacció (vegeu Figura 4.12). La formació de la PYO es va observar fàcilment mitjançant TLC gràcies a l'aparició d'una taca de color blau cian, color característic del pigment i del qual prové el nom de la molècula. Acte seguit, es va provar de reproduir la mateixa reacció reduint la quantitat de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ i emprant nitrometà a 100°C com a dissolvent, però no va resultar satisfactori. Així doncs el mètode descrit per Surrey en aquest cas va poder ser reproduït amb l'obtenció de la piocianina amb un rendiment del 93%. La identificació estructural es va fer en base a l'aparició del senyal corresponent al grup metil a δ 4,01 en l'espectre NMR ^1H .

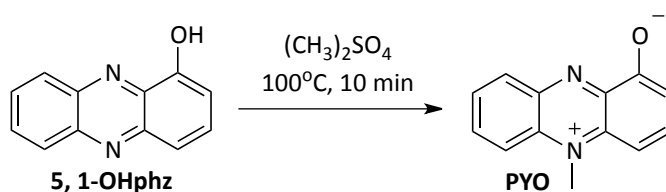
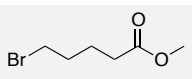
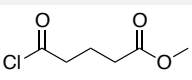



Figura 4.12 Síntesi de la PYO.

a.3 Reacció de 5N-alquilació per a l'obtenció del haptè A.

L'obtenció del haptè A consistia en la introducció del braç espaiador en la posició 5N del conjunt aromàtic de la 1-OHphz (5). El primer assaig es va realitzar amb el 5-bromo pentanoat de metil en dioxà anhidre a reflux, però no es va observar cap evolució de la reacció ni per TLC ni per NMR ^1H . Seguidament, es va assajar la reacció emprant agents alquilants més potents com són els halurs d'alquil $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{I}$ i CH_3I sense obtenir el resultat esperat. La falta de reactivitat es va atribuir al fet d'haver realitzat les reaccions a pressió atmosfèrica, atès que, en aquest context Kitahara *et al.*¹⁵⁹ havien descrit rendiments del 20% en alquilacions sobre substrats fenazínics emprant reactors a altes pressions, dels qual no disposàvem en el nostre laboratori. També es van realitzar assajos de N-alquilació amb el compost 4-cloro-carboxibutimetil èster i amb àcid fòrmic, però ni l'acilació ni la formilació corresponents van poder ser apreciades. A la Taula 4.2 es mostren totes les condicions assajades sense èxit per alquilar o acilar aquest nitrogen. Aquests resultats negatius, ens van portar a pensar que la 1-OHphz (5) és un compost d'elevada estabilitat i consegüentment poc reactiu, motiu pel qual a la literatura es descriu que precisa altres pressions per al seu funcionament¹⁵⁹. A conseqüència d'aquests resultats, es va decidir abordar una nova estratègia sintètica per a la preparació d'haptens de piocianina on la introducció del braç espaiador es realitzés abans de l'etapa de ciclació per a la formació de l'estructura fenazina.

Taula 4.2 Condicions dels diversos experiments que es van assajar per a la N-alquilació de 1-OHphz.

Exp	A	Equivalents	Dissolvent	Temp (°C)	Resultat
1	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$	1 : 41	A	100	R= CH_3
2	 5-bromo pentanoat de metil	1:1.1	Dioxà anh.	101	-
3	CH_3I	1 : 2	CH_2Cl_2 anh.	40	-
4	CH_3I	1 : 4	$\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2$	100	-
5	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{I}$	1 : 2	CH_3Cl	61	-
6	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{I}$	1 : 4	Nitrometà	100	-
7	 4-cloro-carboxibutimetil ester	1:1.1	Dioxà anh.	101	-
8	 Àcid Fòrmic	1 : 28	A	80	-

a.4 Reacció de O-alkilació per a l'obtenció del haptè B

Donada l'escassa reactivitat de la 1-OHphz (5) vers les reaccions de N-alkilació, es va optar per abordar la preparació de l'haptè B, en el qual el braç espaiador s'introdueix en l'estructura fenazínica en la posició del grup hidroxil mitjançant una reacció de substitució nucleòfila. Amb aquest propòsit, es va fer reaccionar la 1-OHphz (5) amb NaH i una vegada obtingut el corresponent anió es va afegir 5-bromo pentanoat de metil. El seguiment per TLC i ¹H-NMR de la reacció tampoc no indicava cap canvi.

A priori, ens havia semblat que l'obtenció dels haptens A i B seria senzill, atès que els braços espaiadors s'introdueixen directament sobre l'estructura de la fenazina (5) a través dels heteroàtoms reactius. A més, la síntesi de la fenazina (5) ja havia estat descrita anteriorment²¹⁹. En vista de l'escassa reactivitat de la 1-OHphz (5) i de la impossibilitat d'obtenir els haptens A i B amb els procediments assajats, es va abordar la síntesi de l'haptè C, en què el braç espaiador està unit directament a l'estructura aromàtica de la fenazina (vegeu Figura 4.7). Per assolir aquest objectiu va ser necessari dissenyar una nova estratègia sintètica. Els treballs realitzats en aquesta direcció es troben descrits a l'apartat següent.

b Preparació de l'haptè C i obtenció dels anticossos corresponents.

En aquesta estratègia, tots els epítops característics de la molècula queden exposats al sistema immune de l'hoste; per tant a priori semblava que aquest haptè podria proporcionar anticossos amb millors qualitats tant pel que fa a l'afinitat com a la selectivitat. El coneixement adquirit durant les síntesis anteriors ens feia pensar que el metil de la posició (5) de la PYO era relativament làbil, motiu pel qual havia estat tan difícil alquilar o acilar aquesta posició. Una prova d'aquest fet va ser que amb una simple reacció en medi basic la PYO es converteix quantitativament en 1-OHphz en tan sols 20 min (vegeu Figura 2S de la publicació X recollida a l'apartat 4.3.6). Així doncs, es va decidir canviar d'estratègia per abordar la producció d'anticossos contra la 1-OHphz (5), un dels altres pigments també segregats per *P. aeruginosa* i el metabòlit principal de la PYO. D'aquesta manera, els anticossos generats permetrien quantificar immunoquímicament els dos pigments simultàniament, en el cas de la PYO després d'un simple tractament.

La síntesi de l'haptè C (haptè PC1) es va aconseguir condensant la benzoquinona (2) amb el 3,4-diaminobenzoat de metil (vegeu Figura 1 de publicació X) en comptes del 1,2-diaminobenzè (3) fet servir anteriorment (vegeu Figura 4.9). Els detalls experimentals del procediment sintètic els trobareu al document de suport que

acompanya a l'article (vegeu apartat 4.3.6). Com a resultat, l'haptè PC1 es va obtenir amb un rendiment global del 3%. Aquest baix rendiment va ser fonamentalment degut a les dificultats trobades durant el procés d'extracció del medi de reacció de les fenazines formades.

Finalment, l'haptè PC1 (vegeu Figura 1 de l'article, apartat 4.3.6) es va conjuguar covalentment a través del grups carboxílics als residus de lisina de la HCH. El conjugat PC1-HCH es va immunitzar a tres conills de tipus New Zealand i quan el títol d'anticòs va ser el desitjat se'n van obtenir els antisèrums, anomenats As230, As231 i As232.

4.3.2 ESTABLIMENT D'UN IMMUNOASSAIG DE TIPUS ELISA PER A LA DETERMINACIÓ DE 1-OHphz I PYO

L'haptè PC1 va ser utilitzat per preparar tant l'immunogen, mitjançant la seva conjugació a HCH, com el competidor, mitjançant la seva conjugació a BSA. Els anticossos generats van permetre establir un protocol d'anàlisi per a la 1-OHphz i la PYO. Tota la informació relacionada amb aquest desenvolupament així com la optimització de l'assaig s'inclou a l'article i el document de suport adjuntats a l'apartat 4.3.6).

Pel cas de la PYO, la mostra s'havia de sotmetre a un tractament en medi bàsic. Aquest tractament va ser estudiat prèviament per HPLC-DAD, fet que va permetre demostrar que es tractava d'una transformació quantitativa (vegeu apartat 4.3.6). A més l'avaluació de l'ELISA As230/PC1-BSA en tampó va demostrar que, inclòs aquest tractament, la tècnica permetia quantificar tots dos anàlits 1-OHphz i PYO amb una gran exactitud (vegeu Taula 4a de apartat 4.3.6). Amb aquests resultats satisfactoris es va procedir doncs a avaluar el funcionament de la tècnica en matrius més complexes, incloent medis de cultiu (vegeu apartat 4.3.3) i també mostres clíniques obtingudes de pacients (vegeu apartat 4.3.4).

4.3.3 QUANTIFICACIÓ DELS PIGMENTS PYO I 1-OHphz EN CORBES DE CREIXEMENT DE MEDIS DE CULTIU DE *P. aeruginosa*

Aquest treball es va fer en col·laboració amb els grups de microbiologia clínica i el servei de pneumologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol (HGTiP), liderats pel Dr. Vicent Ausina i el Dr. Joan Ruiz Manzano, respectivament.

Alguns dels treballs que trobem a la literatura científica han estudiat com afecten els

diferents medis de cultiu a la producció de PYO¹⁸⁴. Si bé la capacitat productora de PYO també es veu influenciada pel tipus de soca, s'ha vist que la presència de glicerol, alanina, sulfur i ferro són propicis per a la producció del pigment. En base a aquestes observacions, el medi *Frank De Moss* ha estat formulat i recomanat per a la detecció de *P. aeruginosa* tot i que en altres medis com ara *Müller Hinton* (MH) o *Luria-Bertani* (LB)¹⁵⁶ el pigment també s'expressa.

Tenint en compte aquesta informació, es van fer créixer diferents soques, algunes d'elles provinents d'hemocultius positius de l'HGTiP i d'altres provinents de col·leccions de bacteris obtinguts al laboratori, en medi MH. Amb l'objectiu d'observar la secreció de PYO en funció del creixement de la soca i comprovar que l'ELISA As230/PC1-BSA desenvolupat era capaç de quantificar-ne els pigments, es van inocular colònies de *P. aeruginosa* en medi de cultiu fresc i es varen extreure alíquotes amb intervals d'una hora (vegeu detalls experimentals a l'apartat 4.6). De cadascuna de les alíquotes es va mesurar la densitat òptica (OD, *optical density*) a una longitud d'ona de 600 nm, que permet relacionar-ho amb la densitat de cèl·lules, i els pigments fenazínics, PYO i 1-OHphz.

Les mesures de PYO i 1-OHphz es van abordar fent servir els sobrenedants obtinguts de cadascuna de les alíquotes (vegeu detalls experimentals a l'apartat 4.6). El potencial efecte inespecífic ocasionat per la matriu del medi de cultiu MH es va avaluar preparant corbes de calibratge a diferents dilucions del medi MH en PBST i comparant amb la corba de referència de l'assaig en tampó PBST. Com a resultat de l'experiment es va decidir treballar a una dilució de medi 1/5 (vegeu Figura 4.13 A). Per tal de poder quantificar la PYO, una part de la mostra havia de ser tractada en medi bàsic. Tal i com mostra la Figura 4.13 B, les corbes de calibratge preparades en medi de cultiu tractat i no tractat eren molt similars, amb el mateix interval de treball i per tant ens permetia quantificar ambdues mostres (tractades i no tractades) en la mateixa corba.

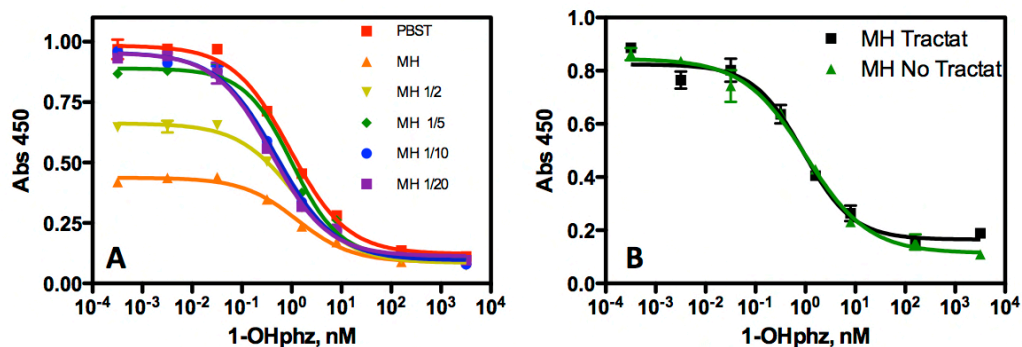


Figura 4.13 Efecte matriu del medi de cultiu *Müller Hinton*. **A.** La figura mostra les diferents corbes de calibratge preparades a partir de dilucions del medi MH en PBST. **B.** La figura mostra les corbes de calibratge en MH (tractat i no tractat) diluït 1/5 en PBST.

Un cop minimitzat l'efecte matriu, es va procedir a la quantificació de les alíquotes obtingudes del cultiu cel·lular a diferents temps. En un primer experiment es van fer créixer en medi MH dues soques que ens va proporcionar la Dra. Dianne Newman de l'Institut de Tecnologia de Califòrnia (*Caltech*, Pasadena, CA). La soca DKN263 és una soca silvestre (*wild type*) mentre que la soca DKN330 és una soca $\Delta phzA1-G1 \Delta phzA2-G2$, on els gens productors de fenazines s'han inactivat¹⁵⁶. Tal i com mostra la Taula 4.3 i la Figura 4.14, la concentració de PYO (línia blava de les gràfiques) i 1-OHphz (línia groga de les gràfiques) dels medis de cultiu on s'havia fet créixer la soca DKN263 augmenta amb el temps, mentre que a aquells on s'havia inoculat la soca DKN330, no se'n va observar la producció, tal com era d'esperar. La línia vermella de les gràfiques correspon a OD a 600 nm (eix esquerre de la gràfica). L'objectiu d'aquesta mesura és obtenir un valor de la llum dispersada (*light scattered*) en el medi, proporcional a la suspensió cel·lular. Per tant, en aquest cas parlarem de OD i no d'absorbància, ja que es tracta d'un concepte de turbulència del medi. Tal com es pot observar, la producció de PYO comença a ser quantificable des del primer moment i incrementa significativament un parell d'hores després que s'hagi produït el creixement exponencial del bacteri. La 1-OHphz en canvi es comença a aparèixer més tard, un cop el bacteri pràcticament ha entrat en estat estacionari.

Els resultats confirmen que el nostre immunoassaig és capaç de detectar aquests pigments segregats per la soca DKN263 durant el seu creixement. A més a més, els resultats negatius obtinguts amb els cultius de la soca DKN330 confirmen que l'efecte matriu del medi de cultiu estava minimitzat, en cas contrari podríem haver obtingut falsos positius en les mesures.

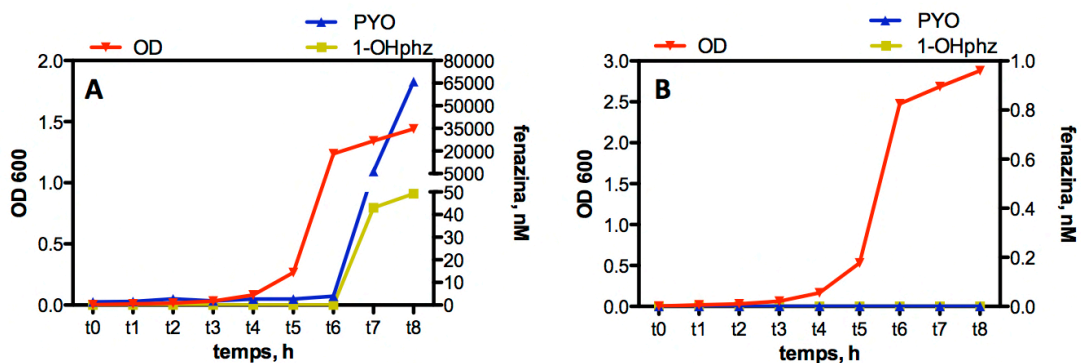


Figura 4.14 Gràfiques que mostra la producció de PYO i 1-OHphz durant el creixement de les soques DKN263 (A) i DKN330 (B) de *P. aeruginosa*. La línia vermella (OD 600 nm) dona informació sobre l'estadi de creixement bacterià. El temps 0 correspon al moment en què s'inocula el medi de cultiu.

Taula 4.3 Concentracions de 1-OHphz i PYO mesurades al llarg del creixement bacterià de les soques DKN263 i DKN330 en medi MH.

DKN 263					DKN 330				
T, h	OD 600 nm ^a	Conc. bact., CFU mL ^{-1b}	1-OHphz, nM ^c	PYO, nM ^c	T, h	OD 600 nm ^a	Conc. bact., CFU mL ^{-1b}	1-OHphz, nM ^c	PYO, nM ^c
0	0,002	1,60·10 ⁶	n.d	1,36 ± 0,08	0	0,004	3,20·10 ⁶	n.d	n.d
1	0,010	8,00·10 ⁶	n.d	1,55 ± 0,05	1	0,020	1,60·10 ⁷	n.d	n.d
2	0,016	1,28·10 ⁷	n.d	2,74 ± 0,11	2	0,032	2,56·10 ⁷	n.d	n.d
3	0,032	2,56·10 ⁷	n.d	1,86 ± 0,06	3	0,064	5,12·10 ⁷	n.d	n.d
4	0,083	6,64·10 ⁷	n.d	2,64 ± 0,16	4	0,166	1,33·10 ⁸	n.d	n.d
5	0,266	2,13·10 ⁸	n.d	2,65 ± 0,12	5	0,532	4,26·10 ⁸	n.d	n.d
6	1,238	9,90·10 ⁸	n.d	3,92 ± 0,31	6	2,476	1,98·10 ⁹	n.d	n.d
7	1,343	1,07·10 ⁹	43,02 ± 4,45	6457,67 ± 10,52	7	2,686	2,15·10 ⁹	n.d	n.d
8	1,441	1,15·10 ⁹	49,27 ± 3,59	65950,73 ± 19,26	8	2,882	2,31·10 ⁹	n.d	n.d

T= temps; n.d= no detectat. ^a Els valors de OD corresponen a una sola mesura. ^b La concentració de bacteri (conc. bac.) és un valor aproximat calculat a partir de la OD a 600 nm, considerant que 1 OD= 8·10⁸ CFU mL⁻¹. ^c Les concentracions obtingudes corresponen a la mitjana i la desviació estàndard de la mesura realitzada en tres pous diferents d'una mateixa placa.

En un segon experiment es va fer créixer una soca de *P. aeruginosa* que provenia d'un hemocultiu positiu d'un pacient de l'HGTiP. A la Taula 4.4 i Figura 4.15 es mostren els resultats obtinguts. De la mateixa manera que en l'experiment anterior, les concentracions de PYO i 1-OHphz augmenten amb el temps, però cal notar la diferència en les concentracions segregades, depenent de la soca i de les condicions utilitzades tal com s'ha descrit en la bibliografia¹⁵⁶. En aquest cas, els valors van ser molt més alts des d'un inici, i els nivells també es van elevar significativament després de 7 h. Aixó no obstant, la cinètica de creixement bacterià va ser molt diferent, i es va observar un creixement molt ràpid després de tan sols 2 h de cultiu. Aquest comportament s'assumeix a les característiques inherents de la soca.

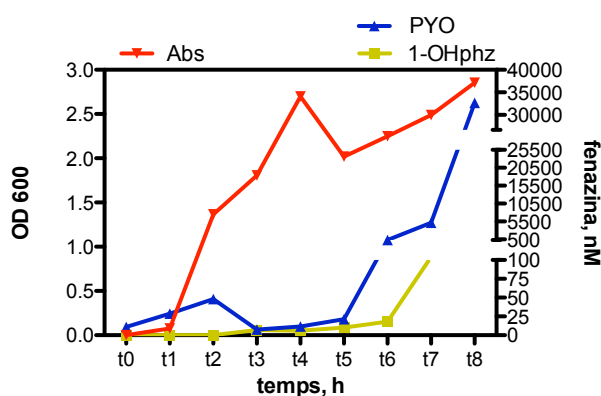


Figura 4.15 Representació de la concentració de les fenazines PYO i 1-OHphz segregades en funció de la corba de creixement de *P. aeruginosa* d'una soca provinent d'hemocultiu positiu.

Taula 4.4 Concentracions de 1-OHphz i PYO mesurades al llarg del creixement bacterià d'una soca provinent d'hemocultiu positiu en medi MH.

Soca d'hemocultiu positiu				
Temps, min	OD 600 nm ^a	Conc. bact., CFU mL ^{-1b}	1-OHphz, nM ^c	PYO, nM ^c
0	0,000	0,00·10 ¹	<i>n.d.</i>	11,00 ± 0,12
1	0,076	6,08·10 ⁷	<i>n.d.</i>	28,72 ± 0,23
2	1,366	1,09·10 ⁹	<i>n.d.</i>	48,16 ± 0,20
3	1,806	1,44·10 ⁹	7,00 ± 0,16	7,55 ± 0,18
4	2,698	2,16·10 ⁹	6,00 ± 0,15	11,74 ± 0,28
5	2,020	1,62·10 ⁹	10,00 ± 0,11	21,38 ± 0,33
6	2,248	1,80·10 ⁹	18,00 ± 0,21	326,66 ± 8,20
7	2,488	1,99·10 ⁹	104,00 ± 4,37	5157,68 ± 15,06
8	2,854	2,28·10 ⁹	294,00 ± 7,39	32653,04 ± 22,08

n.d.= no detectat. ^a Els valors de OD corresponen a una sola mesura. ^b La concentració de bacteri (conc. bac.) és un valor aproximat calculat a partir de la OD a 600 nm, considerant que 1 OD= 8·10⁸ CFU mL⁻¹. ^c Les concentracions obtingudes corresponen a la mitjana i la desviació estàndard de la mesura realitzada en tres pous diferents d'una mateixa placa.

4.3.4 ANÀLISI DE MOSTRES D'ESPUT DE PACIENTS INFECTATS PER *P. aeruginosa*

L'esput és el producte de secreció patològica que és expulsat de les vies respiratòries dels pulmons, compost per mucus i cèl·lules²²³. L'anàlisi de l'esput ens dona informació de la gravetat de la infecció a les vies respiratòries profundes i ens permet fer un seguiment de l'evolució del pacient de manera no invasiva²²⁴.

Una bona part dels resultats d'aquest treball es troben descrits a l'article adjunt (publicació X, vegeu apartat 4.3.6).

L'esput és una mostra heterogènia que primerament ha de ser solubilitzada i homogeneïtzada. Amb aquest fi, els espunts un cop pesats són solubilitzats amb una solució aquosa de ditiotreitrol (DTT, *dithiothreitol*) tal com es descriu a la part experimental de l'article, seguidament les solucions són centrifugades i els sobrenedants utilitzats per l'anàlisi (relació final 125 µg de esput per µL). En una primera instància es va avaluar l'efecte matriu d'aquestes mostres i es va trobar que era possible analitzar els sobrenedants després de diluir-los amb PBST 20 vegades (relació final 6,25 µg de esput per µL), tant en el cas de sobrenedants tractats amb NaOH 1 M per la conversió de PYO a 1-OHphz, com pels sobrenedants no tractats. Amb aquesta situació el límit de detecció de la nostre tècnica és de 4,80 ± 0,08 nmol de 1-OHphz per Kg d'esput (0,60 ± 0,01 nM en el sobrenedant, vegeu Taula 1 de l'article, apartat 4.3.6), i el mateix límit de detecció es pot atribuir pel que fa a la

PYO atès que la conversió és quantitativa i la recuperació molt propera al 100% (vegeu Taula 2 de l'article).

A continuació, es van preparar una sèrie de mostres cegues en les quals els sobrenedants s'havien dopat amb PYO i/o 1-OHphz. Els resultats van demostrar que l'ELISA proporciona mesures força exactes, fins i tot en medis complexos com són els sobrenedants d'esput (vegeu Taula 3B de l'article).

Amb aquest escenari força prometedor, es va procedir a la quantificació de 1-OHphz i PYO a mostres d'esput de pacients amb problemes respiratoris colonitzats per *P. aeruginosa* i no colonitzats, segons dades obtingudes dels laboratoris de microbiologia amb els quals estàvem col·laborant. En un primer estadi, es va treballar amb mostres de pacients amb quadres de sèpsia d'origen respiratori provinents de l'HGTIP. Es van mesurar 12 mostres, cap de les quals va resultar positiva. Totes les mostres havien donat positiu en el cultiu cel·lular, i tenien càrregues bacterianes variables, classificades segons tres categories: baixa, mitjana o alta. Aquest fet ens va sorprendre, ja que d'acord amb els estudis que es recullen a l'apartat 4.1.6, les concentracions de fenazines detectades en mostres biològiques són molt superiors al LOD de l'ELISA As230/PC1-BSA desenvolupat en aquesta tesi doctoral. En base a aquest resultat negatiu, ens vam plantejar treballar amb mostres de pacients infectats per *P. aeruginosa* de llarga durada, ja que tots els treballs previs en què s'han descrit mesures de fenazines en mostres biològiques sense previ cultiu cel·lular eren infeccions de llarga durada, normalment pacients de CF^{170,172}.

Atès que el projecte NanoBioSepRes tenia com a objectius fer aquests estudis amb mostres de pacients amb estadis de sèpsia, va ser molt difícil tenir accés a mostres caracteritzades de malalts crònics. Malgrat tot, es van poder obtenir dues mostres, un pacient amb malaltia pulmonar obstructiva crònica (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*) i un altre pacient amb infecció de llarga durada, amb càrrega bacteriana alta i mitjana, respectivament. Malauradament, ambdues mostres es van mesurar i també van donar negatiu a la presència de pigments fenazínics.

Aquests resultats, ens van portar a contactar amb l'equip del Dr. Xavier de Gracia, cap de la secció de pneumologia de l'Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona, que és l'hospital de referència de CF i malalties cròniques respiratòries de Barcelona. Com a resultat d'aquesta col·laboració vam poder tenir accés a mostres d'esputs provinents de deu pacients crònics amb infeccions de *P. aeruginosa* confirmats i deu esputs de pacients amb problemes respiratoris però no colonitzats per *P. aeruginosa*, segons les proves microbiològiques, que van ser usats com a controls

negatiu. Malauradament, un cop més, les vint mostres mesurades donaren negatiu en el test d'ELISA.

Aquests resultats negatius demostren que és necessari fer una validació del mètode desenvolupat fent servir tècniques analítiques de referència de tipus cromatogràfic acoblats a masses, com els que s'han utilitzat en treballs previs. No obstant això, també cal tenir en compte molts altres factors que podrien explicar la discordança dels nostres resultats amb els publicats anteriorment. Entre les hipòtesis plantejades hi podrien mencionar les següents:

- Les soques amb què estan infectats els pacients dels quals hem obtingut les mostres no són productores de PYO i 1-OHphz o les produeixen en més baixa quantitat.
 - *Aquesta hipòtesi, tot i que possible, té en contra que segons dades reportades a la literatura el 90-95% de les soques de *P. aeruginosa* produeixen aquest pigment²⁸. Per altra banda, tot i que poc significatiu, els estudis de creixement bacterià i producció de PYO descrits anteriorment, en els quals s'havia utilitzat una soca d'un pacient infectat indicaven que la soca era productora.*
- El mètode amb el qual s'han tractat les mostres no és adequat o és molt diferent de l'utilitzat pels altres grups.
 - *S'ha de mencionar que els procediments emprats per obtenir la mostra freqüentment no es troben ben descrits als articles, particularment pel que fa a saber la quantitat d'esput emprada en cada mesura, però també pel que fa a tractaments addicionals. En aquest sentit, ens vam posar en contacte amb la Dra. Newman (California Institute of Technology), que havia publicat alguns treballs molt interessants en què es descrivien nivells de l'ordre de 20-50 µM en mostres d'esput. Ella ens va proporcionar detalls addicionals del protocol que empraven per al tractament de l'esput, fet que ens va permetre constatar que el mètode que empràvem nosaltres no era tan diferent, a més de comparar els nostres resultats amb els seus. Això va confirmar que la nostra tècnica tenia una detectabilitat molt alta i que hauria d'haver estat suficient per poder quantificar la PYO i la 1-OHphz en mostres d'esput.*
- Els pigments han degradat.
 - *Aquesta hipòtesi no sembla gaire possible ja que en la nostra experiència, quan havíem treballat amb mostres dopades, això no s'havia produït. A més a més, en cas que la PYO degradés, el més*

probable és que perdés el metil i es convertís en 1-OHphz, fet que s'hauria pogut demostrar amb el nostre ELISA. Una altre hipòtesi podria ser la possibilitat que la PYO hagués format part d'alguna reacció redox i per tant es trobés en la seva forma reduïda^{167,225}. Aquesta forma sembla que és un producte incolor, fet que encaixaria amb l'aspecte de les mostres analitzades, i a causa de l'alta especificitat de l'As230 per la 1-OHphz, no seria capaç de detectar-la. Assumint, a més, que la PYO reduïda no es pot convertir a 1-OHphz amb el tractament en medi bàsic. Aquesta segona hipòtesi també implicaria el fet que la 1-OHphz no s'hagués segregat o bé també hagués patit algun tipus de transformació.

- L'entorn en què es troba la infecció no és favorable per a la segregació dels pigments
 - Se sap que l'entorn en què es troba la *P. aeruginosa* és un factor clau per a la producció dels pigments¹⁸⁴, per tant potser l'entorn en què han crescut les soques testejades no ha estat propici per excretar la PYO ni la 1-OHphz.
- Les concentracions de fenazines són baixes i caldria fer un precultiu de la mostra per poder-les detectar.
 - *Aquesta podria ser una hipòtesi relacionada amb l'anterior, en la qual l'entorn no ha estat el més idoni per a la producció dels pigments. En aquest cas es podria comprovar fent un precultiu dels esputs per veure si així augmentava la concentració en el medi. Millora el LOD de la tècnica seria una alternativa si es confirmés la hipòtesi. Tanmateix, el LOD de l'ELISA és inferior al reportat per les altres tècniques amb què s'han detectat els pigments en mostres de pacients. Així doncs, d'entrada no sembla que sigui un problema de detectabilitat de l'assaig.*

El que sembla clar de tots aquest estudis és que futures investigacions adreçades a implementar la tecnologia desenvolupada a l'àmbit clínic precisen d'una validació exhaustiva de la tècnica, fent servir mètodes de referència, però també una clara implicació de grups clínics tant de l'àmbit assistencial com dels corresponents serveis de microbiologia, per tal de poder discutir els resultats i per una valoració crítica que permeti anar re-orientant el projecte adequadament. No podem tampoc obviar la necessitat de disposar de finançament per realitzar aquesta investigació, així com la necessària implicació del sector privat en aquest tipus de recerca. L'aproximació tecnològica desenvolupada en aquesta tesi doctoral pel diagnòstic de malalties infeccioses causades de *P. aeruginosa*, es troba patentada i diverses

empreses tant europees com dels Estats Units han mostrat interès. Esperem, doncs, que sigui possible tornar a la societat la inversió, i el treball realitzat es tradueixi en una tècnica de diagnòstic que podria representar un gran benefici en favor de la salut dels malalts.

A continuació, en les següents publicacions, es descriu el treball realitzat per a l'obtenció d'un haptè d'immunització contra la 1-OHphz i el posterior desenvolupament d'un immunoassaig per a la detecció de 1-OHphz i PYO i se'n discuteixen els resultats obtinguts.

4.3.5 PUBLICACIÓ IX: HAPTENS I CONJUGATS DERIVATS DE LA PIOCIANINA, ANTICOSSOS CONTRA ELS MATEIXOS, I MÈTODE IMMUNOQUÍMICA PER A LA DETECCIÓ D'INFECCIONS PROVOCADES PER *Pseudomonas aeruginosa*

Haptenos y conjugados derivados de piocianina, anticuerpos de los mismos, y método inmunoquímico para la detección de infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*

M.-Pilar Marco, Núria Pascual, Carme Pastells, Francisco Sanchez, Antonio Pedro Villaverde i Escarlata Rodríguez

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) 76%
Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) 21,5%
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) 2,5%

Número de sol·licitud: PCT PCT/ES2014/070161

Resum:

Aquest treball patenta els immunoreactius de la piocianina i la 1-hidroxifenazina, així com també els anticossos produïts contra aquests anàlits i el mètode immunoquímic desenvolupat que permet per primera vegada la detecció d'aquests dos anàlits mitjançant un assaig immunoquímic. Aquest treball ha estat posteriorment enviat a la revista *Analytical Chemistry* per ser publicat (vegeu apartat 4.3.6 pels detalls del treball desenvolupat).

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

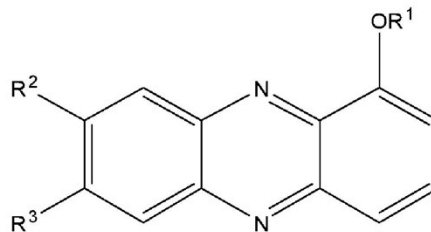
(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional(43) Fecha de publicación internacional
12 de septiembre de 2014
(12.09.2014)(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/135730 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07D 241/46 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070161
- (22) Fecha de presentación internacional:
4 de marzo de 2014 (04.03.2014)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P 201330312 5 de marzo de 2013 (05.03.2013) ES
- (71) Solicitantes: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED EN BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y NANOMEDICINA (CIBER-BBN) [ES/ES]; Poeta Mariano Esquillor, s/nº, Edificio I+D+I, Blq. 5 - 1ª Pta, E-50018 Zaragoza (ES). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA [ES/ES]; Edifici A - Campus Universitari, s/nº, Bellaterra, E-08193 Barcelona (ES).
- (72) Inventores: MARCO COLÁS, María Pilar; Consejo Superior De Investigaciones Científicas (CSIC), Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). PASCUAL DURÁN, Nuria; Consejo Superior De Investigaciones Científicas (CSIC), Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). PASTELLS DÍEZ, Carme; Consejo Superior De Investigaciones Científicas (CSIC), Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). SANCHEZ BAEZA, Francisco; Consejo Superior De Investigaciones Científicas (CSIC), Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). VILLAVERDE CORRALES, Antonio Pedro; Universidad Autónoma de Barcelona, Edifici A - Campus Universitari, S/nº, Bellaterra, E-08193 Barcelona (ES). RODRÍGUEZ CARMONA, Escarlata; Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Poeta Mariano Esquillor, s/nº, Edificio I+D+I, Blq. 5 - 1ª, E-50018 Zaragoza (ES).
- (74) Mandatario: PONS ARIÑO, Angel; Glorieta Rubén Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: HAPTENES AND CONJUGATES DERIVED FROM PYOCYANIN, ANTIBODIES THEREOF, AND IMMUNOCHEMICAL METHOD FOR DETECTING INFECTIONS CAUSED BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA

(54) Título: HAPTENOS Y CONJUGADOS DERIVADOS DE PIOCIANINA, ANTICUERPOS DE LOS MISMOS, Y MÉTODO INMUNOQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIONES PROVOCADAS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA



(I)

(57) Abstract: The invention relates to a compound of general formula (I) and to the use thereof as a hapten. The invention also relates to a conjugate of said compound I with a carrier protein or fragment thereof, with a detectable marking agent, or with a polymer or support, and to the use thereof for producing antibodies. The invention also relates to a method for the detection and/or quantification of 1-hydroxyphenazine and/or pyocyanin using said antibodies and conjugates for the detection of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]

WO 2014/135730 A1

WO 2014/135730 A1 

KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,

Publicada: — con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) y su uso como hapteno. Es asimismo objeto de la presente invención, un conjugado del compuesto I anterior con una proteína transportadora o fragmento de la misma, con un agente de marcaje detectable, o con un polímero o soporte, así como su uso para la obtención de anticuerpos. Además, la presente invención también hace referencia a un método para la detección y/o cuantificación de 1-hidroxifenazina y/o piocianina que utiliza los anticuerpos y conjugados anteriores para la detección de infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

4.3.6 PUBLICACIÓ X: DETERMINACIÓ IMMUNOQUÍMICA DE PIOCIANINA I 1-HIDROXIFENAZINA COM A POTENCIALS BIOMARCADORS D'INFECCIÓ PER *Pseudomonas aeruginosa*

Immunochemical Determination of Pyocyanin and 1-Hydroxyphenazine as Potential Biomarkers of *Pseudomonas aeruginosa* Infections

Carme Pastells, Núria Pascual, Francisco Sánchez i M.-Pilar Marco

Enviat a la revista *Analytical Chemistry*

Resum:

Aquest article descriu el desenvolupament d'un assaig per a la detecció d'infeccions causades per *P. aeruginosa* mitjançant un ELISA en placa en format competitiu indirecte. Els anticossos desenvolupats són específics per a la 1-OHphz, i s'ha establert un protocol que permet la detecció simultània de 1-OHphz i PYO. Mitjançant un pretractament de mostra de 20 min amb una solució alcalina s'elimina el grup metil de la piocianina per convertir-la en 1-OHphz. L'As230 amb què s'ha desenvolupat l'assaig detecta la 1-hidroxifenazina amb un LOD de $0,04 \pm 0,01$ nM en tampó. La reactivitat creuada amb la piocianina és $< 0,1\%$.

Com a prova de concepte el mètode s'ha aplicat a mostres d'esput de pacients amb problemes respiratoris. L'efecte matriu de l'esput en l'ELISA s'ha minimitzat amb una dilució de la mostra, prèviament tractada amb DTT per trencar els enllaços disulfur de l'esput. Els paràmetres de detectabilitat assolits en l'esput han estat LOD $0,60 \pm 0,01$ nM ($4,80 \pm 0,08$ pmol Kg⁻¹ esput).

L'exactitud del mètode ha estat avaluada en mesurar mostres fortificades a una concentració coneguda en tampó i en esput, i en ambdós casos s'han obtingut bons resultats.

Immunochemical Determination of Pyocyanin and 1-Hydroxyphenazine as Potential Biomarkers of *Pseudomonas aeruginosa* Infections

Carme Pastells^{a,b}, Nuria Pascual^{a,b}, Francisco Sanchez-Baeza^{‡,a,b} and M.-Pilar.

Marco^{a,b,*}

Nanobiotechnology for Diagnostics (Nb4D), IQAC-CSIC^a. Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain^b. Jordi Girona, 18-26, 08034-Barcelona, Spain

[‡]This work is dedicated to the memory of Dr. Francisco Sanchez-Baeza.

*To whom correspondence should be sent:

M.-Pilar Marco

E-mail: pilar.marco@cid.csic.es

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Pyocyanin, 1-Hydroxyphenazine, Cystic Fibrosis, Immunoassay, sputum

ABSTRACT

A novel immunochemical approach to diagnose *Pseudomonas aeruginosa* infections is reported, based on the quantification of relevant and specific virulence factors secreted by this microorganism. Specific antibodies have been raised using hapten PC1, designed to recognize 1-hydroxyphenazine (1-OHphz) which is the main metabolite of pyocyanin (PYO), one of the most important virulence factors produced by nearly all *P. aeruginosa* strains. With these antibodies an immunochemical analytical procedure able to quantify both, 1-OHphz and PYO, in complex clinical samples has been developed. 1-OHphz can be directly measured in solubilized sputum samples diluted 20 times with the assay buffer. Quantification of PYO is accomplished after conversion to 1-OHphz in just 20 min under basic conditions. A LOD of 0.60 ± 0.01 nM (4.80 ± 0.08 nmol Kg⁻¹ sputum) is reached for both biomarker targets under the conditions established, much below the reported concentration values found on sputum samples obtained from infected patients (up to 100 µM). The assay can be run in about 2 h and many samples can be measured simultaneously.

INTRODUCTION

Healthcare-associated infections (HAI) are still today one of the first causes of death in the developing countries. Each year, in the European Union (EU), 4 million patients are estimated to acquire HAI and approximately 37000 of them die as direct result of the infection²²⁶. *Pseudomonas aeruginosa* is between the microorganisms most frequently isolated in intensive care units (ICU) and in a variety of diseases or injuries such as severe burn wounds, AIDS, lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease, bronchiectasis, pneumonia, cystic fibrosis (CF)²²⁷ and urinary and bloodstreams infections.

Currently, pathogen identification methods are based on classic cell culture enrichment followed by identification by biochemical means. These methods are time consuming and the detectability achieved is often not sufficient unless long cell culture enrichment periods (minimum of 24 h) are employed, which are unacceptable in certain situations. Hence, in the case of a sepsis the patient can enter in shock within a frame period of 24-48 h. Moreover, lacking of identification of the causative agent, leads to prescription of broad spectra antibiotics contributing to increase antibiotic resistance. PCR methods that sequence and amplify a specific DNA of the microorganism²²⁸ require high qualified personnel and prior tedious DNA extraction and purification steps. In spite of the efforts invested to implement these procedures on point-of-care (PoC) diagnostic devices, suitable for small local laboratories, no reliable easy to use tools have been made available. Alternatively, immunochemical analytical methods, already well implemented in clinical laboratories, have evolved towards sophisticated and efficient immunosensor devices able to provide real-time responses in the presence of a particular target (i.e. ²²⁹⁻²³²). In combination with recently discovered nanobiotechnological principles and approaches, the benefits can be expanded to satisfy the needs for the clinical diagnostic field²³³⁻²⁴⁰.

P. aeruginosa expresses a wide variety of virulence factors that are powerful manipulators and destroyers of the host cells, including proteases, hemolysins, exotoxin A and secondary metabolites such as pyocyanin (PYO, 1-methoxy-5-methyl phenazine) and 1-hydroxyphenazine (1-OHphz; see figure 1). PYO has been recognized as one of the main virulence factors produced by this microorganism. Due to its zwitterionic nature and redox properties PYO can penetrate cell membranes and generate reactive oxygen species in the intracellular redox cycling, producing a wide spectrum damage on human cells^{164,241}. *P. aeruginosa* is the only microorganism known to produce PYO, for which reason some authors have pointed at the use of this phenazine for phenotypic identification of this bacteria and as a potential biomarker of infectious diseases caused this pathogen. Thus, PYO has

always been found to be secreted at significant concentrations by cultured clinical isolates²⁴²⁻²⁴⁵. On a study performed with patients hospitalized in intensive treatment units of Brazilian hospitals, the isolates taken from different samples (rectum, tracheal aspirate, mouth, blood, urine, venous catheter, pleural secretion, eschar, lung of CF, sputum and nasal secretion) showed a mean production of $9.61 \pm 4.32 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ranging from 1.29 to $25.94 \mu\text{g mL}^{-1}$)¹⁶⁹. Moreover, certain studies claim the use of PYO also to predict exacerbation periods or assess response to treatment²⁴⁴. Furthermore, concentrations up to 50-100 μM of PYO and 1-OHphz have also been detected measuring directly sputum samples obtained from *P. aeruginosa* infected patients²⁴⁶⁻²⁴⁸, observing a certain correlation between concentration levels and the severity of the disease²⁴⁶.

The most frequently used methods for phenazine analysis are based on the measurement of their characteristic absorbance spectra²⁴⁹⁻²⁵² and also by HPLC-DAD (or MS)^{246,248,253,254}, but these methods are not suitable for routine clinical diagnostic since previous extraction and purification procedures are required which significantly increase analysis time and complicates the examination. More recently, other approaches have been reported such as electrochemical sensors^{247,255,256}, that exploit the particular redox properties of PYO, and surface-enhanced raman spectroscopy (SERS)²⁵⁷. SERS reaches high detectability, although the sample has also to be extracted with an organic solvent (i.e. chloroform) and added on top of a plasma cleaned silver nanorod substrate before the SERS spectra is acquired. Even though the novelty of the approaches, any of these methods have readily been implemented on *in vitro* or *in vivo* (animal models or human patients) studies as diagnostic tools. Moreover, none of these sensors are completely specific since they lack of a specific receptor.

With this scenario, we have addressed development of specific antibodies for PYO and 1-OHphz and use them to develop a high-throughput screening (HTS) immunochemical assay. Thus, in the present paper, we report for the first time a HTS-ELISA method to determine PYO and 1-OHphz in biological samples. Moreover, we assess performance of this method in a complex clinical sample such as sputum showing the potential of this approach to diagnose *P. aeruginosa* caused infections.

EXPERIMENTAL SECTION

General methods and instruments. See Supporting Information

Buffers. Unless otherwise indicated phosphate-buffered saline (PBS) is 10 mM phosphate buffer with 0.8% saline solution, and the pH is 7.5. PBST (assay buffer) is PBS with 0.05% Tween 20. 10X PBS is PBS ten times concentrated. Coating buffer is 50 mM carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6. Citrate buffer is a 40 mM solution of sodium citrate pH 5.5. The substrate solution contains 0.01% TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and 0.004% H₂O₂ in citrate buffer. Borate buffer is 0.2 M boric acid/sodium borate pH 8.7.

Chemicals and Immunochemicals. The chemical reagents were obtained from Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO) and Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). **1-OHphz** and **PYO** used as standards were synthesized following described procedures^{258,259} as described in the Supporting Information. Biochemicals and immunochemicals as well as certain phenazines used for cross-reactivity studies were obtained from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO). Other phenazines were obtained from Acros Organics (Geel, Belgium). The antibodies have been developed making use of the ICTS "NANBIOSIS", specifically the Custom Antibody Service (CAbs) Unit, of the CIBER in Bioengineering, Biomaterials & Nanomedicine (CIBER-BBN at the IQAC-CSIC).

Hapten synthesis. The 1-OHphz hapten was obtained following a similar synthetic route to the one described by Surrey²⁵⁹ with slight modifications (see figure 1 and Supporting Information for details).

Examination of the Conversion of PYO into 1-OHphz. Solutions of PYO (2.5 mM, 100 µL) were prepared in PBS and phenazine (0.5 mM, 150 µL) was added as internal standard. The solutions were treated with 2 M NaOH (250 µL) at RT and samples (10 µL) were taken from the reaction media at every 5 min interval, diluted with 100 mM PB (100 µL) and neutralized with 1 M HCl (aprox. 10 µL) before to inject them into the HPLC system.

Protein Bioconjugates

PC1-HCH (MA) and PC1-BSA (MA): Hapten PC1 was covalently attached through its carboxylic group to the lysine residues of HCH (horseshoe crab hemocyanin) and BSA (bovine serum albumin) following the mixed anhydride (MA) method as previously described²⁶⁰. Briefly, tributylamine (1.3 µL, 5.5 µmol) and isobutylchloroformate (0.77 µL, 6 µmol) were added to a solution of the hapten (1.2 mg, 5 µmol) in anhydrous DMF (100 µL) placed in an ice bath, afterwards the

mixture was left to reach room temperature for about 30 min. The activated hapten was added dropwise to a solution of HCH or BSA (5 mg) in borate buffer (0.9 mL) for 4 h at RT. The conjugates were dialyzed against 0.5 mM PBS (4 x 5L) and the final amount of protein recovered after dialysis was quantified by Bradford protein assay. Aliquots prepared at 2 mg mL⁻¹ in 10 mM PBS were stored at -80°C and working aliquots were kept at 4°C. Both, the BSA and HCH conjugates were prepared simultaneously. The BSA conjugate was used to assess conjugation by MALDI-TOF/TOF-MS as described below.

PC1-BSA (AE): The hapten PC1 was coupled to BSA using the active ester (AE) method. Briefly, the hapten (1.2 mg, 5 μmol) was reacted with dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 5.2 mg, 6 μmol) and N-hydroxysuccinimide (NHS, 1.44 mg, 6 μmol) in anhydrous DMF (100 μL) under stirring for 1 h at RT. The suspension formed was centrifuged at 10000 rpm for 10 min and the supernatant was added dropwise to a solution of BSA (10 mg) in borate buffer (1.8 mL) and stirred for 4 h at RT. The bioconjugates were dialyzed and stored as described before. Hapten density was characterized by MALDI-TOF/TOF-MS.

MALDI-TOF/TOF-MS analysis of the bioconjugates. The hapten densities of the BSA conjugates were calculated by MALDI-TOF/TOF-MS by comparing the molecular weight of the unreacted protein with those of the conjugates. MALDI spectra were obtained by mixing 2 μL of the matrix (trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, 10 mg mL⁻¹ in 70:30 CH₃CN:H₂O, 0.1% TFA) with 2 μL of a solution of the conjugate or protein (10 mg mL⁻¹ in 70:30 CH₃CN:H₂O, 0.1% TFA). The hapten densities obtained were 20 and 10 for PC1-BSA (AM) and PC1-BSA (AE), respectively.

Polyclonal antibodies. Three female New Zealand white rabbits weighting 1-2 Kg were immunized with PC1-HCH (MA) according to the immunization protocol previously reported²⁶⁰. The antisera obtained from the immunization with PC1-HCH (MA) were labeled as As230, As231 and As232. Evolution of the antibody titer was assessed by measuring the binding of serial dilutions of the antisera to microtiter plates coated with PC1-BSA (MA) conjugates. After an acceptable antibody titer was observed, the rabbits were exsanguinated and the blood was collected in vacutainer tubes provided with a serum separation gel. Antiserum was obtained by centrifugation 15 min at 4000 rpm and stored at -80°C in the presence of 0.02% NaN₃. Working aliquots were stored at 4°C.

Titration and two-dimensional experiments. The appropriate dilutions of the antisera and the PC1-BSA coating Ag for the indirect competitive ELISA were established after a 2D checker board titration assay performed with the three antisera obtained²⁶⁰.

1-OHphz ELISA [As230/PC1-BSA (AE)]. Microtiter plates were coated with PC1-BSA (AE) ($0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ in coating buffer $100 \mu\text{L well}^{-1}$) for 4 h at 25°C . Then, the plates were washed with PBST ($4 \times 300 \mu\text{L}$) and solutions of the PC1 standards (from 3200 nM to 0 nM) or the samples, treated as described below and diluted with the assay buffer, were added ($50 \mu\text{L well}^{-1}$), followed by the solution of the antiserum As230 ($1/8000$ in PBST, $50 \mu\text{L well}^{-1}$). After 30 min at room temperature, the plates were washed as before and the anti-IgG-HRP solution ($1/6000$ in PBST, $100 \mu\text{L well}^{-1}$) was added and incubated for 30 min more. After another cycle of washes, the substrate solution was added ($100 \mu\text{L well}^{-1}$), and the enzymatic reaction was stopped after 30 min at room temperature with $2 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ($50 \mu\text{L well}^{-1}$). The absorbances were measured at 450 nm.

Cross reactivity determinations. Stock solutions of different compounds structurally related to PYO and 1-OHphz were prepared (10 mM in dimethyl sulfoxide) and stored at 4°C . Standard curves were prepared in PBST and run in the ELISA following the protocol described before. The cross-reactivity values were calculated according to the following equation (IC_{50} 1-OHphz [nM]/ IC_{50} phenazinic compounds [nM]) $\times 100$.

Sputum Samples. The sputa collected was solubilized as follows: a solution of DTT (0.1% w/v in water, $600 \mu\text{L}$) was added to the sputum samples (150 mg) and stirred for 30 min at RT. Afterwards, PBS ($600 \mu\text{L}$) was added and the solution passed through a $48 \mu\text{m}$ nylon gauze filter and centrifuged (10 min, 4000 G). The supernatant collected was aliquoted and stored at -40°C . After this treatment, 1 mg of sputum corresponds to a solution of $8 \mu\text{L}$. Representative blank sputum was prepared by mixing equal volumes of samples from 10 different patients diagnosed as not having *P. aeruginosa* infection.

Sample (PBS or sputum samples) Treatment: Samples were split in two parts, one of them (A) was directly used for **1-OHphz quantification** after appropriate dilution with the assay buffer while the other one (B) was used to measure the total 1-OHphz in the sample after **conversion of PYO into 1-OHphz**. For this purpose, 10 M NaOH ($10 \mu\text{L}$) was added to the sample ($100 \mu\text{L}$) and the mixture was stirred for 20 min at RT. Afterwards, 10X PBS ($100 \mu\text{L}$) was added followed by the addition of 10 M HCl to adjust the pH (aprox. $10 \mu\text{L}$) and mixture diluted with milliQ water up to 1 mL. After this treatment the sample could be aliquoted and stored at -80°C until analysis.

Matrix Effect Studies. Nonspecific interferences produced by the treated and non-treated sputum have been assessed by preparing standard curves of 1-OHphz in sputum supernatant diluted several times ($1/5$ to $1/200$) with PBST. The curves were

run in the ELISA to compare the parallelism with the standard curve prepared in PBST.

Accuracy studies. Blind buffer (5) or sputum supernatant (17) samples were prepared by spiking them with 1-OHphz and/or PYO at several concentrations (0.5 nM to 100 μ M), treated as described above and measured in the 1-OHphz ELISA to know the 1-OHphz and PYO concentration. The last value was obtained by substrating the 1-OHphz found to the total 1-OHphz measured on part B (see SI for additional details of this procedure).

Recovery studies. a. Sample treatment: The recovery of the sample treatment (conversion of PYO into 1-OHphz) was evaluated spiking PBS samples (10) with 1-OHphz or PYO (from 0.5 to 250 nM) and treating them as described above. **b. Whole process:** The recovery of the whole treatment process was evaluated by spiking sputa (150 mg) with 1-OHphz and PYO (from 0.08 to 800 μ mol Kg⁻¹ sputum), solubilizing the sputa and treating the sample as described above before ELISA measurements

RESULTS AND DISCUSSION

A novel immunochemical strategy to diagnose *Pseudomonas aeruginosa* infections has been developed. The assay is based on the detection of 1-OHphz and PYO, two phenazines excreted by this microorganism. PYO is one of the most important virulence factors and has been found to be specific of *P. aeruginosa*. Antibodies have been raised against PC1, a hapten mimicking 1-OHphz. PYO only differs from 1-OHphz on the methyl group at N5. A simple treatment allows eliminating this methyl group from PYO to render 1-OHphz, which permits the quantification of both analytes using a single antibody.

The synthesis of PC1, as 1:1 isomeric mixture of hydroxyphenazine carboxylic acids **5** (see Supporting information for experimental details), was accomplished following the procedure described by Surrey in 1995²⁵⁹ for PYO with slightly modifications (see figure 1). The strategy consisted on the condensation of the methoxy-[1,2]benzoquinone **1** with the methyl 3,4-diaminobenzoate **2**. The benzoquinone **1** was obtained from 3-metoxycatechol (step i) using o-chloranil as oxidative agent²⁶¹. Previous attempts using PbO₂²⁵⁹ rendered very poor yields. Condensation of the benzoquinone **1** with the methyl 3,4-diaminobenzoate **2** (obtained from the corresponding commercial carboxylic acid derivative, step ii) allowed to obtain the methoxyphenazine carboxylates **3** (step iii), as a 1:1 mixture of positional isomers

with a 41 % yield. Separation of the two isomers could be accomplished by HPLC, however, since the molecule epitopes exposed to generate antibodies were practically the same for both isomers we decided to immunize with the 1:1 mixture. This moderate yield was due to the benzoquinone **1** tendency to polymerize, reducing the equivalents available for the condensation with the methyl 3,4-diaminobenzoate **2**, plus the difficulties to extract the phenazine from the crude media. The methoxyl group was then converted to a hydroxyl group (step iv) with a 10% yield by treating the mixture with BBr_3 in CH_2Cl_2 ; HBr was also tested giving even poorer reaction yields. Finally the methyl esters of the hydroxyphenazines **4** were hydrolyzed (step v) with KOH to obtain the desired hapten PC1 as 1:1 isomeric mixture regarding the position of the carboxyl group. The overall yield of the whole synthetic procedure was only 3% due to the difficulties encountered for extraction of the phenazine as mentioned above, but mainly due to the low yield of the hydrolysis of the methoxy group which could not be improved in spite of the efforts. Previously, we attempted to synthesize a PYO hapten alkylating the N-5 position of 1-hydroxyphenazine, however this reaction failed due to the low reactivity of this nitrogen. Although Kitahara et al described N-alkylation of several phenazines²⁶² under high pressure conditions, these results could not be reproduced in our laboratory.

Antibodies (As230-As232) were raised in White New Zealand rabbits immunized with PC1-HCH (MA). The avidity of antibodies *versus* PC1-BSA (AE and MA) was assessed with the intention to find out the most appropriate conditions for the competitive immunochemical assay. As a result of those experiments, five usable competitive immunoassays (see table 1S) were obtained and the As230/PC1-BSA (AE) antiserum/bioconjugate combination was selected for further studies. The effect of different physico-chemical conditions on the assay (such as the concentration of the surfactant Tween 20, the ionic strength and the pH of the PBS) were evaluated (see figure 1S) with the intention to assess performance of the assay in several media and to improve the features of the assay. Hence, the assay is stable between pH 5 to 9.5, it is not significantly affected by the content of Tween 20, however the detectability is better in media with ionic strength values over 10 mS cm^{-1} . Under the conditions established 1-OHphz could be analyzed in buffer samples in just about 1.30 h with a LOD of $0.01 \pm 0.01 \text{ nM}$ ($N= 3$ days, see table 1 and figure 2B). Moreover, specificity studies demonstrated that the assay was very specific for 1-OHphz (see table 2). Other phenazines tested, including PYO, showed cross-reactivity values below 0.1%.

Since PYO was our specific target, we investigated the conversion of PYO into 1-hydroxyphenazine. The N-5 desmethylation was monitored by HPLC-DAD using phenazine as an internal standard. 1M NaOH accomplished the quantitative

conversion in just 20 min at RT (see graph in figure 2S). To ensure a good quantification of both phenazines in a single sample the procedure designed, schematized in figure 2A, consisted on splinting the samples in two parts, one (A) for direct quantification of 1-OHphz, after appropriate dilution with the assay buffer, while the other (B) was treated with 1 M NaOH to convert the PYO into 1-OHphz to quantify total 1-OHphz. The difference between both values would correspond to the concentration of PYO in the sample ($[PYO] = \text{Total 1-OHphz} - [1\text{-OHphz}]$). Prior the ELISA, sample B was buffered and neutralized as described in the experimental section. As result of this treatment, the sample was 10 times diluted in PBS. Subsequent dilutions to avoid potential matrix interferences or to place the samples within the dynamic range of the assay were performed with PBST.

The recovery of the conversion of PYO into 1-OHphz was also evaluated by ELISA, quantifying a set of 1-OHphz and PYO spiked samples, treated as described above and quantified with the As230/PC1-BSA (AE) ELISA (see table 2S). Samples spiked with either PYO or 1-OHphz gave very good recoveries demonstrating that 1-OHphz is not destroyed in this process and that the conversion of PYO to 1-OHphz was quantitative, as previously demonstrated by the HPLC-DAD when setting up the conditions (see figure 2S graph).

With these results we approached the implementation of this methodology to the analysis of sputum samples. Patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection have been reported to have high content of PYO in their sputum as demonstrated by HPLC analysis^{246,248}. Thus, sputum samples from patients not infected with *P. aeruginosa* were obtained, solubilized and pooled to investigate the potential nonspecific interferences caused by this matrix. Hence, the solubilized sputum samples were splinted in two parts (A and B), treated as described above, and subsequently diluted at different dilution factors with PBST to prepare standard curves. The distinct curves were run in the As230/PC1-BSA (AE) ELISA and compared with the standard curve prepared in PBST. As it can be observed, a dilution of 20 times was found to be sufficient to avoid the interferences caused by the sputum components (see figure 3S). Therefore, for further quantification of unknown sputum samples fraction A, for the quantification of 1-OHphz, could be directly diluted 20 times with PBST, while fraction B, used to quantify the total 1-OHphz, after the conversion of PYO into 1-OHphz (B), had to be diluted 1/2 with PBST, since the conversion procedure already dilutes the sample 10 times.

Both, A and B fractions behave similarly in the assay, as it can be observed in figure 4S, indicating that quantification, 1-OHphz, initially present in the samples, and total 1-OHphz, obtained after PYO conversion, can be quantified with the same standard curve, independently from the sample treatment applied. Under these conditions, 1-

OHphz and PYO can be analyzed in sputum samples, with a LOD of 0.60 ± 0.01 nM (4.80 ± 0.08 nmol Kg⁻¹ sputum, $N= 2$ days)(see table 1, figure 2B), much below the reported values found in sputa samples obtained from patients infected with this microorganism²⁴⁶⁻²⁴⁸.

Recovery studies of the whole analytical process was performed by spiking solid sputum samples with 1-OHphz and/or PYO at different concentrations, treating them as described in the experimental section and analyzing them by ELISA. As it can be observed in table 3, the recoveries were very good for almost all of the samples, except for those close to the detection limit (i.e. sample #1, 10 nM and 0.5 nM after 1/20 dilution of the sputum supernatant) demonstrating the potential of the immunochemical analytical procedure developed to analyze PYO and 1-OHphz in this complex clinical sample.

Finally, accuracy studies were performed by analyzing a set of blind samples prepared by spiking buffer and *pooled blank solubilized sputa* with 1-OHphz and/or PYO. Prior the ELISA analysis the samples were treated as described above. For the case of the buffer samples the application of a 1/20 dilution factor was not necessary, being possible to directly analyze the samples. The accuracy was excellent as it can be observed in table 4a-b.

CONCLUSIONS

A new promising immunochemical analytical strategy for the diagnostic of infectious diseases caused by *P. aeruginosa* has been developed and implemented for the analysis of complex clinical samples, such as sputa. The immunochemical approach is addressed to detect PYO and 1-OHphz two of the most important and specific virulence factors secreted by this microorganism and reported to be found in culture media where this bacteria grows and in biological fluids from infected patients. The results here reported demonstrate that the microplate-ELISA is reliable and able to quantify both biomarker targets accurately in a complex sample such as sputa at levels below those reported on samples from infected patients. Further studies will be addressed to investigate other potential sample matrices, as well as to probe the diagnostic value of the targets selected. Thus, *P. aeruginosa* is the most common and important pathogen in chronic pulmonary infections. Detection of the presence of this pathogen at early colonization stages could reduce morbidity and eventual mortality for these patients by prescribing more appropriate and specific antibiotic treatment while reducing the appearance of resistant strains. The availability of rapid, selective and sensitive diagnostic methods for infectious diseases remains a challenge. In this context, it is worth noting that the antibodies and the technology here reported shows great potential due to the possibility to detect the

microorganism without the need of culture and enrichment steps. Moreover, the immunoreagents developed could be implemented in distinct analytical configurations depending on the requirements. Thus, point-of-care (PoC) immunosensor devices could be developed to rapidly indicate the presence of the bacterium in a particular sample. Overall, the performance of the immunoreagents reported in this work, could improve the quality of life of the patients infected by *P. aeruginosa*, reducing exacerbation and acute episodes related to the disease and favoring their survival.

ACKNOWLEDGMENTS

This research has been funded by the CIBER-BBN through the project MICROPLEX and by MICINN, through the project NanoMeDiag (MICINN, EUI2008-00175). The AMR group is a consolidated *Grup de Recerca de la Generalitat de Catalunya* and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (expedient 2009 SGR 1343). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&i Plan 2008-2011, *Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions* and financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the *European Regional Development Fund*. We acknowledge Elisa Martró, Elena Jordana and Vicente Ausina from Hospital Universitari Germans Trias i Pujol for his collaboration and sputum samples provided. We also acknowledge Prof. Antonio Villaverde, Éscar Rodríguez and Elena García for the helpful discussions regarding selection of the targets. Carme Pastells has a FI fellowship from the AGAUR (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca) of the Government of Catalonia (Generalitat de Catalunya).

REFERENCES

- (1) European Center for Control and Disease Prevention, <http://www.ecdc.europa.eu>
- (2) Williams, B. J.; Dehnhostel, J.; Blackwell, T. S. *Respirology (Carlton, Vic.)* **2010**, *15*, 1037-1056.
- (3) Anuj, S. N.; Whiley, D. M.; Kidd, T. J.; Bell, S. C.; Wainwright, C. E.; Nissen, M. D.; Sloots, T. P. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *63*, 127-131.
- (4) Pang, W.; Zhao, H.; Kim, E. S.; Zhang, H.; Yu, H.; Hu, X. *Lab Chip* **2012**, *12*, 29-44.
- (5) Prodromidis, M. I. *Electrochim Acta.* **2010**, *55*, 4227-4233.
- (6) Bojorge Ramirez, N.; Salgado, A. M.; Valdman, B. *Braz. J. Chem. Eng.* **2009**, *26*, 227-249.
- (7) Mohammed, M.-I.; Desmulliez, M. P. Y. *Lab Chip* **2011**, *11*, 569-595.
- (8) Fernandez, F.; Sanchez-Baeza, F.; Pilar Marco, M. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *34*, 151-158.
- (9) Valiokas, R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 347-356.
- (10) Sotiriou, G. A. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* **2012**, *5*, 19-30.
- (11) Schulz, A.; McDonagh, C. *Soft Matter* **2012**, *8*, 2579-2585.
- (12) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. *Chem Rev.* **2012**, *112*, 2739-2779.
- (13) Jain, K. K. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 2002-2009.
- (14) Lee, S. H.; Sung, J. H.; Park, T. H. *Ann. Biomed. Eng.* **2012**, *40*, 1384-1397.
- (15) Sanvicens, N.; Pastells, C.; Pascual, N.; Marco, M. P. *Trends Analyt Chem.* **2009**, *28*, 1243-1252.
- (16) Lau, G. W.; Hassett, D. J.; Ran, H.; Kong, F. *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 599-606.
- (17) Muller, M. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 1670-1677.
- (18) Mowat, E.; Paterson, S.; Fothergill, J. L.; Wright, E. A.; Ledson, M. J.; Walshaw, M. J.; Brockhurst, M. A.; Winstanley, C. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *183*, 1674-1679.
- (19) Caldwell, C. C.; Chen, Y.; Goetzmann, H. S.; Hao, Y.; Borchers, M. T.; Hassett, D. J.; Young, L. R.; Mavrodi, D.; Thomashow, L.; Lau, G. W. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 2473-2488.
- (20) Fothergill, J.; Panagea, S.; Hart, C.; Walshaw, M.; Pitt, T.; Winstanley, C. *BMC Microbiology* **2007**, *7*, 45.
- (21) Cabeen, M. T. *PloS one* **2014**, *9*, e88743.
- (22) Silva, L. V.; Galdino, A. C.; Nunes, A. P.; Dos Santos, K. R.; Moreira, B. M.; Cacci, L. C.; Sodre, C. L.; Ziccardi, M.; Branquinha, M. H.; Santos, A. L. *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 990-1000.
- (23) Hunter, R. C.; Klepac-Ceraj, V.; Lorenzi, M. M.; Grotzinger, H.; Martin, T. R.; Newman, D. K. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2012**, *47*, 738-745.
- (24) Webster, T. A.; Sismaet, H. J.; Conte, J. L.; Chan, I. P.; Goluch, E. D. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *60*, 265-270.
- (25) Wilson, R.; Sykes, D. A.; Watson, D.; Rutman, A.; Taylor, G. W.; Cole, P. J. *Infection and Immunity* **1988**, *56*, 2515-2517.
- (26) Kurachi, M. *Bull. Inst. Chem Res.* **1958**, *36*, 174-187.
- (27) Essar, D. W.; Eberly, L.; Hadero, A.; Crawford, I. P. *J. Bacteriol.* **1991**, *172*, 884-900.
- (28) Malley, Y. Q.; Reszka, K. J.; Spitz, D. R.; Denning, G. M.; Britigan, B. E. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2004**, *287*, L94-L103.
- (29) El-Mowafy, S. A.; Abd El Galil, K. H.; El-Messery, S. M.; Shaaban, M. I. *Microb Pathog.* **2014**, *74*, 25-32.

- (30) Watson, D.; MacDermot, J.; Wilson, R.; Cole, P. J.; Taylor, G. W. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *159*, 309-313.
- (31) Reimer, Å. *Acta Otolaryngol* **2000**, *120*, 86-88.
- (32) Sharp, D.; Gladstone, P.; Smith, R. B.; Forsythe, S.; Davis, J. *Bioelectrochemistry* **2010**, *77*, 114-119.
- (33) Chen, W.; Liu, X. Y.; Qian, C.; Song, X. N.; Li, W. W.; Yu, H. Q. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *64c*, 25-29.
- (34) Wu, X.; Chen, J.; Li, X.; Zhao, Y.; Zughair, S. M. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* **2014**.
- (35) Vivian, D. L. *Nature* **1956**, *178*, 753.
- (36) Surrey, R. A. *Organic Syntheses Collective* **1955**, *3*, 753-756.
- (37) Ballesteros, B.; Barceló, D.; Camps, F.; Marco, M.-P. *Anal. Chim. Acta.* **1997**, *347*, 139-147.
- (38) Carlson, B.; Miller, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 479-485.
- (39) Kitahara, T.; Kinoshita, Y.; Aono, S.; Miyake, M.; Hasegawa, T.; Watanabe, H.; Mori, K. *Pure & Appl. Chem.* **1994**, *66*, 2083-2086.

FIGURES

Figure 1. Chemical structures of PYO and 1-OHphz (blue box). Scheme for the synthesis of Hapten PC1. (i) o-chloranil in anh. Et₂O, -20°C, 15 min. 79% yield. (ii) thionyl chloride in MeOH, reflux, 11h, 94% yield. (iii) CH₃COOH:Et₂O, r.t., 1.5h. 41% yield. (iv) BBr₃ in CH₂Cl₂. 10% yield. (v) 1M KOH in THF, r.t., 30 min. 97% yield.

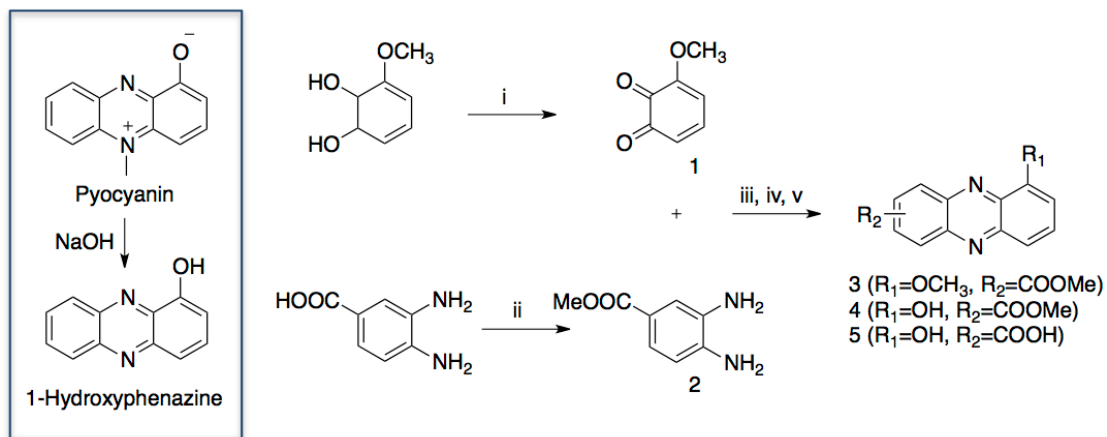
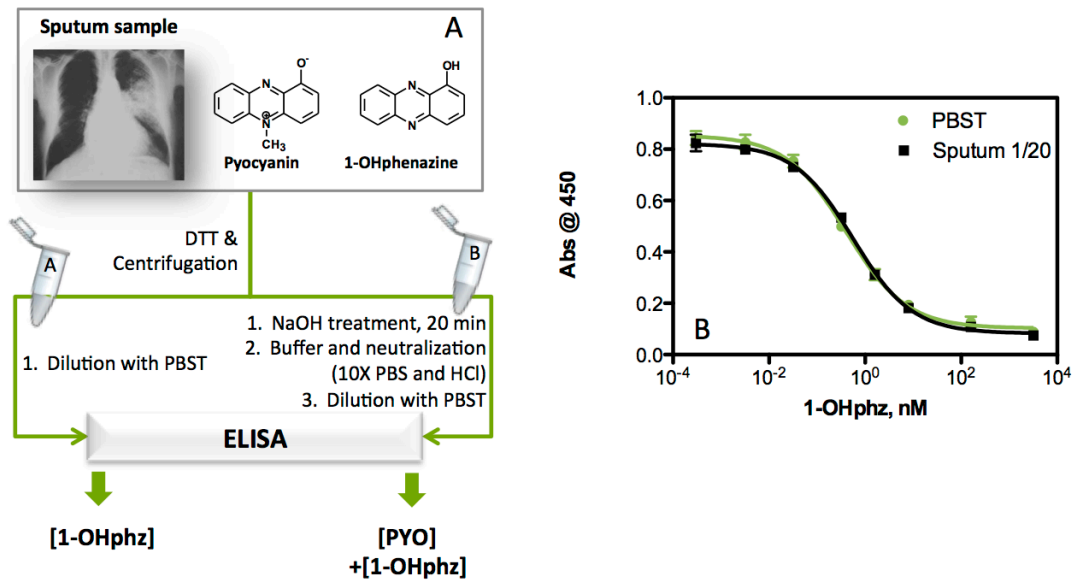


Figure 2. Graph A: Schematic representation of process for the quantification of PYO and 1-OHphz in sputum sample quantification. **Graph B:** 1-OHphz calibration curves of the As230/PC1-BSA (AE) ELISAs to quantify the initial concentration of 1-OHphz and the total 1-OHphz after the conversion of PYO into this metabolite. **PBST:** Calibration curve to quantify buffer or sputum diluted 1/20 spiked samples. **Sputum 1/20:** Calibration curve performed with sputum diluted 1/20; showing an almost completely minimized matrix effect. The data shown are the average and standard deviations of assays performed in different days ($N= 3$ days for PBST and $N= 2$ days for sputum) and each concentration point was run on triplicates on each microplate. See table 1 to know the immunoassay parameters. The sputum is a pool of sputa from 10 healthy individuals



TABLES

Table 1. Parameters of the As230/PC1-BSA (AE) ELISA in buffer and in sputum samples^a.

	PBST ^c	Sputum diluted 1/20 ^{d,e}
Amax	0.78 ± 0.03	0.83 ± 0.04
Amin	0.18 ± 0.03	0.09 ± 0.01
Slope	-0.87 ± 0.04	-0.71 ± 0.01
IC₅₀^b	0.53 ± 0.04	11.2 ± 1.03 (89.6 ± 8.24 ^f)
Dynamic range	0.06 ± 0.01 to 3.57 ± 0.51	1.59 ± 0.24 to 85.38 ± 6.23 (12.72 ± 1.97 to 683.04 ± 49.84 ^f)
IC₉₀ (LOD)^b	0.01 ± 0.01	0.60 ± 0.01 (4.80 ± 0.08 ^f)
R²	0.992 ± 0.003	0.997 ± 0.003

^a The sputum sample is a pool of sputa collected from 10 individuals testing negative for *P. aeruginosa*. ^b All the concentrations are expressed in nM unless specified. The parameters shown are the average and standard deviation of assays performed on three ^c or two ^d different days and each point of the calibration curve was run on three-well replicates. ^e The concentration values have been multiplied by twenty, to provide the real detectability in the original sample, taking into consideration the dilution factor applied prior the analysis to avoid the interferences caused by the matrix. ^f Concentrations expressed in nmol of 1-OHphz per Kg⁻¹ of sputum.

Table 2. Cross-Reactivity of different phenazinic compounds in the As230/PC1-BSA (AE) ELISA

Phenazine	IC ₅₀ , nM	CR, %
1-Hydroxyphenazine	0.62	100
Pyocyanin	>800	<0.1
Phenazine	>800	<0.1
Phenazine-2-carboxylic acid	>800	<0.1
5-Methylphenazinium methyl sulfate	140	0.4

Taula 3. Recovery of the whole analytical process for the analysis of 1-OHphz and PYO in sputum samples ^a.

Sputum Samples #	Conc. Spiked		Recovery, %	
	1-OHphz	PYO	1-OHphz ^d	PYO
1	0.08	0.08	155	60
2	0.8	0.8	135	70
3	2.4	2.4	81	150
4	24	24	97	83
5	80	80	79	75
6	200	200	101	106
7	240	240	84	105
8	800	800	104	110

^aSputum samples are individual sputum obtained from patients not infected with *P. aeruginosa*. Solid sputum samples spiked with 1-OHphz and PYO, solubilized with DTT, treated as described in the experimental section and measured with the As230/PC1-BSA (AE) ELISA. ^b The results are the average and standard deviation of measurements made in three-well replicates during two different days. All the concentrations are expressed in μmol of 1-OHphz per Kg^{-1} of sputum.

Table 4a. Results from the accuracy studies of the As230/PC1-BSA (AE) ELISA in buffer.

Samples #	Conc. Spiked		Conc. Measured ^b		
	1-OHphz	PYO	1-OHphz	Total 1-OHphz ^d = [PYO]+[1-OHphz]	[PYO] = [Total 1-OHphz] -[1-OHphz]
Buffer ^a	0.5	0.5	0.51 ± 0.09	1.06 ± 0.30	0.54 ± 0.31
	1	1	0.78 ± 0.34	2.56 ± 0.46	1.78 ± 0.56
	5	5	4.26 ± 0.65	10.68 ± 2.60	6.42 ± 2.68
	50	50	61.69 ± 1.16	110.43 ± 5.84	48.74 ± 5.93
	200	200	269.26 ± 6.01	494.31 ± 4.66	225.05 ± 7.06

^a Buffer samples were spiked with 1-OHphz and PYO treated as described in the experimental section and measured by ELISA. ^b The results are the average and standard deviation of measurements made on three-well replicates on 3 different days. All the concentrations are expressed in nM.

Table 4b. Results from the accuracy studies of the As230/PC1-BSA (AE) ELISA analyzing sputum samples

Samples ✓	Conc. Spiked		Conc. Measured ^b		
	1-OHphz	PYO	1-OHphz ^c	Total 1-OHphz ^d ([PYO]+[1-OHphz])	[PYO] ([Total 1-OHphz] – [1-OHphz])
	0.5	-	0.48 ± 0.05	0.48 ± 0.05	-
	0.5	0.5	0.512 ± 0.09	1.92 ± 0.80	1.41 ± 0.81
	-	2.5	-	2.34 ± 0.37	2.34 ± 0.37
	5	-	4.32 ± 0.56	4.32 ± 0.56	-
	-	5	-	4.25 ± 1.15	4.25 ± 1.15
	5	5	4.42 ± 1.13	12.86 ± 4.73	8.44 ± 4.86
	50	-	51.66 ± 2.38	51.66 ± 2.38	-
	-	50	-	55.57 ± 7.5	55.57 ± 7.5
Sputum samples ^a	50	50	46.61 ± 4.01	111.52 ± 9.92	64.91 ± 10.70
	250	-	246.09 ± 43.14	246.09 ± 43.14	-
	-	250	-	179.63 ± 17.17	179.63 ± 17.17
	-	500	-	555.66 ± 88.49	555.66 ± 88.49
	250	250	247.51 ± 55.60	493.95 ± 103.81	246.44 ± 117.76
	-	1000	-	1035.88 ± 25.39	1035.88 ± 25.39
	-	10000	-	7219.19 ± 829.25	7219.19 ± 829.25
	-	50000	-	50146.19 ± 1685.17	50146.19 ± 1685.17
	-	100000	-	72434.53 ± 1347.23	72434.53 ± 1347.23

^a Sputum samples obtained from individuals testing negative for *P. aeruginosa* infection were solubilized with DTT, pooled and subsequently spiked with 1-OHphz and/or PYO. The spiked samples were, treated as described in the experimental section and measured by ELISA. ^b The results are the average and standard deviation of measurements made on three-well replicates on 3 different days. All the concentrations are expressed in nM. ^c For the samples that did not contain PYO, the 1-OHphz concentration values shown correspond to the average and standard deviation of the results obtained for treated (total 1-OHphz) and non-treated fractions (1-OHphz).

Supporting information

1. GENERAL METHODS AND INSTRUMENTS.

Thin-layer chromatography (TLC) was performed on 0.25 mm pre-coated silica gel 60 F254 aluminum sheets (Merck, Darmstadt, Germany), and the separations of the different compounds synthesized were done by column chromatography with silica gel (pore size 60 Å, 230-400 mesh particle size). ¹H NMR spectra were recorded on a Varian Inova-500 (Varian Inc., Palo Alto, CA) spectrometer (500 MHz for ¹H). Exact masses were acquired using a Waters Acquity ultra-performance liquid chromatographic (UPLC) system (Waters Corp., Milford, MA) using as detector a Waters LCT Premier XE ESI-TOF-MS in positive mode. The column used was Acquity UPLC C18 2.1 X 100 mm (1.7 µm; Waters, Milford, MA). HPLC-UV analysis was performed using a LaChrom Elite L-2130 HTA pump with a diode array L-2455 detector and L-2200 autosampler and a D7000 interface (Merck, Darmstadt, Germany). The elution of PYO and 1-OHphz was monitored at 314 and 294 nm, respectively. The chromatograms were processed with the EZChrom Elite software (Merck, Darmstadt, Germany). The column used was Lichrosphere 100 RP-18 Endcaped 125 X 4 (5 µm; Merck; Darmstadt, Germany). The analyses were performed at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ using the following program gradient as mobile phase: min 0: 15:85 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer (adjusted to pH 9 with HCl); min 2: 15:85 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 8: 40:60 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 14: 90:10 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 16: 90:10 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 18: 15:85 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 20: 15:85 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer. The system was calibrated by injecting under these conditions PYO and 1-OHphz standard solutions (5 vials from 15 to 250 µM, in PBS) using phenazine (final concentration 13.6 µM) as internal standard.

The MALDI-TOF/TOF-MS/MS (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer) used to characterize the protein conjugates was an AutoFLEX III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a 200-Hz smart beam laser. The pH and the conductivity of all buffers and solutions were measured with a pH meter pH 540 GLP and a conductimeter LF 340, respectively (WTW, Weilheim, Germany). Polystyrene microtiter plates were purchased from Nunc (Maxisorp, Roskilde, Denmark). Washing steps were carried out using an ELx405 HT microplate washer (BioTek, Winooski, VT). Absorbances were read using a SpectamaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at a single wavelength mode of 450 nm. The competitive curves were analyzed with a four-parameter logistic equation using the software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices), and GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $Y = [(A-B)/(1 - (x/C)^D)] + B$,

where A is the maximal signal, B is the minimum signal, C is the concentration producing 50% of the maximal signal, and D is the slope at the inflection point of the curve. Data presented correspond to the average of at least two well replicates.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Synthesis

1-Hydroxyphenazine. 1-Hydroxyphenazine was synthesized following the synthesis described by Vivian in 1956²⁵⁸. A yellow powder was obtained with a 94% yield. ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃); δ ppm): 7.20 (dd, 1H_{Ar}, J=1.5Hz, J=7.4Hz), 7.69 (dd, 1H_{Ar}, J=1.5Hz, J=8.7Hz), 7.78 (dd, 1H_{Ar}, J=7.2Hz, J=8.7Hz), 7.94 (m, 2H_{Ar}), 8.21 (m, 1H_{Ar}), 8.29 (m, 1H_{Ar}) UPLC ESI(+) calculated for C₁₂H₈N₂O (M+) 196.0637, found 197.0696.

Pyocyanin. Pyocyanin was obtained from 1-hydroxyphenazine by selective methylation of the N5 in order to obtain the blue toxin following the procedure already described²⁵⁹ to obtain the desired compound with 53% yield. UPLC ESI(+) calculated for C₁₃H₁₀N₂O (M+) 210.0793, found 211.0862.

Hapten synthesis:

Methyl 9-methoxyphenazine-2-carboxylate and methyl 6-methoxyphenazine-2-carboxylate methyl ester (from now on methoxyphenazine carboxylates 3). 3,4-Diaminobenzoic acid (2 g, 13.14 mmol) was converted to methyl 3,4-diaminobenzoate **2** (2.04 g, 12.27 mmol, 94% yield) using thionyl chloride (1.24 mL, 17.1 mmol) in MeOH (50 mL) at reflux for 11 h. In parallel, a solution of 3-methoxycatechol (2 g, 14.27 mmol) in anhydrous Et₂O (50 mL) at -20°C was oxidized using o-chloranil (3.65 g, 14.84 mmol) as described by Ansell and Carlson^{261,263} to obtain 3-methoxy-[1,2]benzoquinone **1** (1.56 g, 11.29 mmol, 79% yield) as a dark green solid separated by filtration. The solid was washed with Et₂O and the final residue obtained (700 mg, 5.06 mmol) was immediately redissolved in CH₂Cl₂ (30 mL) and added dropwise to a solution of the methyl ester **2** (660 mg, 3.97 mmol) in the same solvent (10 mL) slightly acidified with acetic acid (5 drops). After stirring for 1.5 h at RT, the solution was diluted with water (20 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (10 mL), dried (Mg₂SO₄) and the solvent removed in vacuo. The product was purified by flash silica gel chromatography using 1:1 EtOAc:hexane as mobile phase to obtain the desired compound as a 1:1 mixture of isomers in the form of a yellow solid (110 mg, 0.43 mmol, 41% yield). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.03 (s, 6H, 2-COOCH₃), 4.18 (s, 6H, 2-OCH₃), 7.09 (dd, 2H_{Ar}, J=7.51Hz, J=11.75Hz), 7.9 (m, 4H_{Ar}), 7.82 (m, 4H_{Ar}), 8.95 (s, 1H_{Ar}), 9.15 (s, 1H_{Ar}).

Methyl 9-hydroxyphenazine-2-carboxylate and methyl 6-hydroxyphenazine-2-carboxylate (from now on hydroxyphenazine carboxylates 4). A solution of the 1:1 mixture of the methoxyphenazine carboxylates **3** (81 mg, 0.30 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (2 mL) was cooled to -75°C and a solution of 1 M boron tribromide in CH₂Cl₂ (410 µL, 0.41 mmol) was added. After stirring for 15 min, the reaction mixture was allowed to reach room temperature and then stirred for 10 h more. Afterwards, the reaction flask was submerged on an ice bath (0°-4°C) and distilled water was added dropwise, until the excess of boron tribromide was destroyed. The residue was then extracted with CH₃Cl (2 mL), dried (Mg₂SO₄) and the solvent removed in vacuo. Flash silica gel chromatography was employed to purify the reaction mixture yielding the desired mixture of isomers **4** as a red/brown solid (23 mg, 90.6 µmol, 10% yield)²⁶⁴. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.03 (s, 3H, 2-OCH₃), 4.05 (s, 3H, 2-OCH₃), 7.27 (m, 2H_{Ar}), 7.80 (m, 3H_{Ar}), 8.24 (m, 3H_{Ar}), 8.38 (m, 2H_{Ar}), 7.92 (s, 1H_{Ar}), 8.98 (s, 1H_{Ar}).

9-Hydroxy-phenazine-2-carboxylic acid and 6-Hydroxy-phenazine-2-carboxylic acid (from now on hydroxyphenazine carboxylic acids 5, Hapten PC1). The 1:1 mixture of hydroxyphenazine carboxylates **4** (20 mg, 78.7 µmol) was dissolved in a solution of 0.5 M KOH in THF (1mL) and stirred for 30 min at RT. Afterwards, the THF was removed by distillation and the aqueous solution remained was washed with saturated NaHCO₃ (5 mL) and EtOAc (5 mL x 3 times). The yellow aqueous phase was then acidified to pH 3 with 5 M HCl and extracted with EtOAc (3 x 5 mL). The combined EtOAc organic extracts were dried over Mg₂SO₄ and the solvent removed in vacuo until dryness. The resulting orange powder was washed with Et₂O (5 mL) and filtered through a filter plate to give a 1:1 mixture of the expected hapten **5** (13 mg, 54.2 µmol, 97 % yield) as a 1:1 mixture of positional isomers. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ 7.26 (dd, 2H_{Ar}, J=7.5Hz, J=5Hz), 7.74 (dd, 2H_{Ar}, J=10Hz, J=10Hz), 7.85 (m, 2H_{Ar}), 8.33 (m, 4H_{Ar}), 8.77 (s, 1H_{Ar}), 8.84 (s, 1H_{Ar}). UPLC ESI(+) calculated for C₁₃H₈N₂O₃ (M+) 241.0613, found 241.0606.

2.2. Accuracy studies

a. Buffer Samples. 5 blind samples prepared in PBS were spiked with 1-OHphz and PYO at several concentrations, and measured in the As230/PC1-BSA (AE) ELISA. Samples were split in two portions (90 µL each). One was directly measured by ELISA (A), while the other (B) was treated with 1 M NaOH (10 µL) for 20 min. Afterwards, 10X PBS (90 µL) was added followed by the addition of 10 N HCl (10 µL) and filled up to 900 µL (1/10 dilution) with milliQ water. After the treatment, sample B was ready to be measured by ELISA.

b. Sputa Samples. 17 blind samples prepared with blank pooled sputa supernatants were spiked with 1-OHphz and/or PYO at several concentrations and measured in

the PBST-III ELISA. Like the buffer samples, each sample was splinted in two portions (90 μ L each). One was directly diluted 20 times with PBST (A) to minimize the matrix effect of the sputum, while the other (B) was treated with 1 M NaOH (10 μ L) for 20 min, after, 10X PBS (90 μ L) was added followed by the addition of 10 N HCl (10 μ L) and filled up to 900 μ L (1/10 dilution) with milliQ water. After that, sample B was additionally diluted 1/2, to finally obtain a total 1/20 dilution of the sample and ensure a minimized sputa matrix effect.

RESULTS

Table 1S: Conditions and features of the five usable indirect competitive ELISA obtained^a.

Coating Antigen, ($\mu\text{g mL}^{-1}$) >	PC1-BSA (AE ^b) (0.125)	PC1-BSA (AE) (0.125)	PC1-BSA (AE) (0.125)	PC1-BSA (MA ^c) (0.125)	PC1-BSA (MA) (0.062)
Antibody (dilution)	As230 (1/8000)	As231 (1/8000)	As232 (1/8000)	As231 (1/8000)	As232 (1/16000)
Amax	0.78 ± 0.03	1.02 ± 0.02	1.36 ± 0.01	1.03 ± 0.01	0.631 ± 0.02
Amin	0.18 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.51 ± 0.02	0.274 ± 0.02
IC₅₀ (nM)	0.53 ± 0.04	8.73 ± 0.08	7.62 ± 0.05	3.25 ± 0.11	0.724 ± 0.17
LOD (nM)	0.01 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.09 ± 0.13	0.01 ± 0.01
Slope	-0.87 ± 0.04	-0.71 ± 0.08	-0.57 ± 0.03	-0.72 ± 0.12	-0.541 ± 0.11
R²	0.992 ± 0.003	0.987 ± 0.047	0.997 ± 0.029	0.973 ± 0.041	0.962 ± 0.031

^a. The parameters were extracted from the four-parameter logistic equation used to fit the standard curves. The data shown is the average and standard deviation of assays of three-well replicates. ^bAE means active ester. ^cMA means mixed anhydride

Figure 1S. Effect of different physico-chemical parameters on the ELISA. The studies were performed by varying the composition of the buffer used in the competitive step. (A) Effect of the ionic strength, the concentration of saline concentration was varied while the concentration of phosphate salts remained constant (10 mM). (B) Effect of the pH; the pH of the PBST buffer was modified by adding small volumes of 1 M HCl or 1 M NaOH. (C) Effect of the concentration of Tween 20 in the assay buffer. Data presented are extracted from the four-parameter equation used to fit the standard curve. pH data correspond to the average effect observed for each pH value, on three assays run in separate microtiter plates. Tween 20 and ionic strength assays were run on duplicate in the same microtiter plate and data shown correspond to the average of the assay run on three different plates. The corresponding axis for each of the parameters (IC_{50} and A_{max}) is indicated in the top graph legend. The IC_{50} values are expressed in nM.

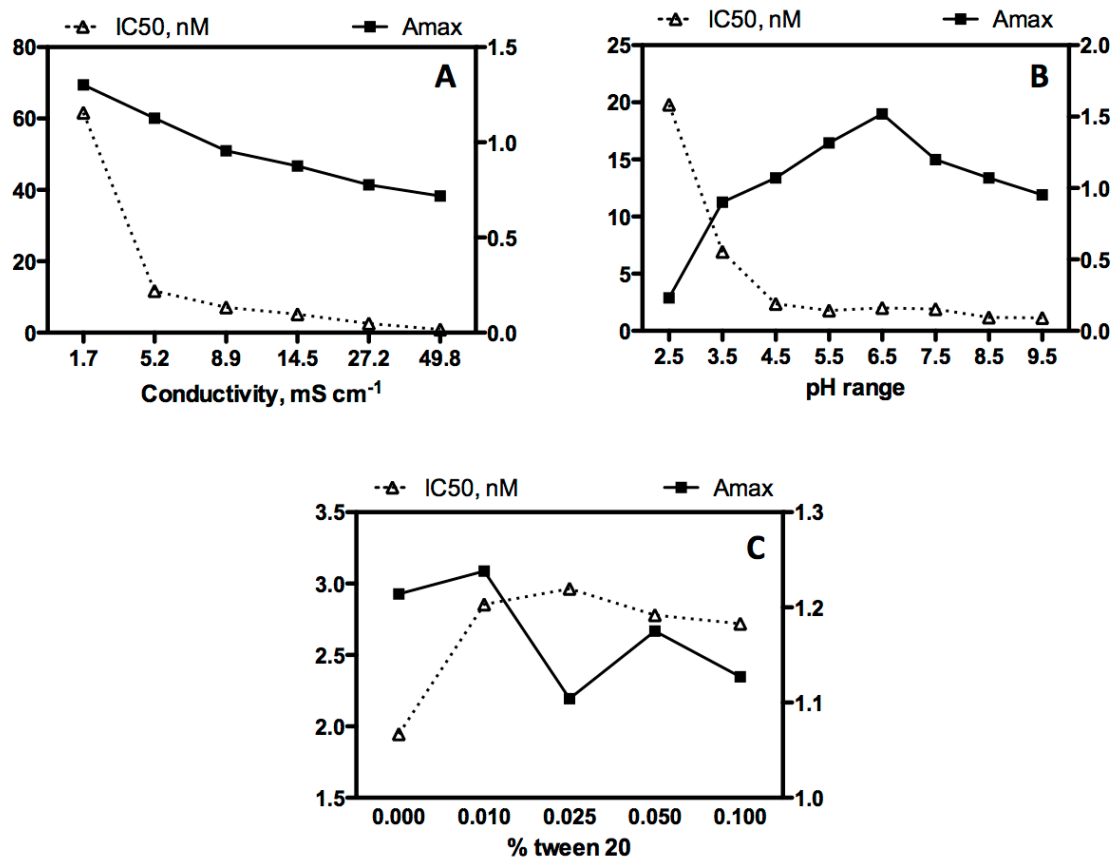


Figure 2S. Conversion kinetics of the conversion of PYO into 1-OHphz using 1M NaOH as described in the experimental section. The reaction was monitored by HPLC-DAD. The analyses were performed using a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ and the mobile phase was the following program gradient: min 0: 15:85 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer (H₂O with 0.3% aq NH₃, adjusted to pH=9 with HCl); min 2: 15:85 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 8: 40:60 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 14: 90:10 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 16: 90:10 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 18: 15:85 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer; min 20: 15:85 ACN: 0.1 N NH₃/NH₄Cl buffer. Calibration was performed as described in the experimental section using phenazine as internal standard. Sample aliquots were removed from the reaction media, mixed with the internal standard and injected in the HLPC for quantification.

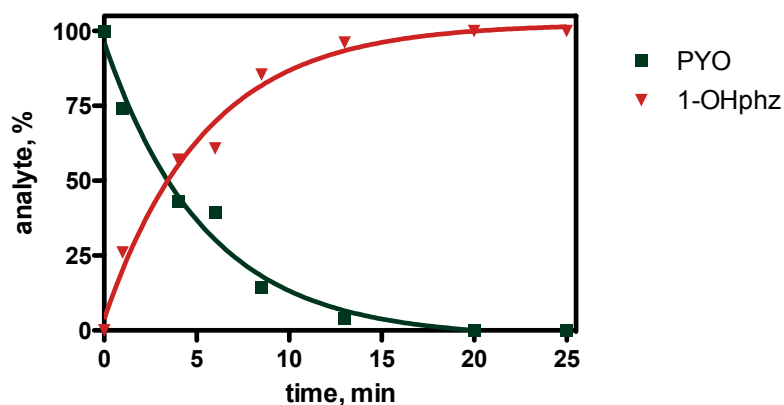


Table2S: Results from the recovery studies related to the conversion of PYO to 1-OHphz.

Samples ▼	Conc. Spiked		Recovery, %	
	1-OHphz, nM	PYO, nM	1-OHphz ^d	PYO
Buffer	0.5	-	138	-
	-	0.5	-	110
	5	-	121	-
	-	5	-	103
	50	-	100	-
	-	50	-	98
	117	-	70	-
	-	117	-	137
	250	-	105	-
	-	250	-	107

Spiked samples were prepared in PBS buffer and quantified in the As230/PC1-BSA (AE) ELISA

Figure 3S. Sputa matrix effect on the As230/PC1-BSA ELISA. The potential nonspecific interferences caused by the sputa were assessed in the As230/PC1-BSA ELISA. 1-OHphz standard curves were prepared with solubilized sputa as described in the experimental section and subsequently diluted with PBST several times. The distinct curves were run in the ELISA and compared with the standard curve prepared in PBST. As it can be observed, the sputa diluted 20 times showed very similar features to that run in PBST.

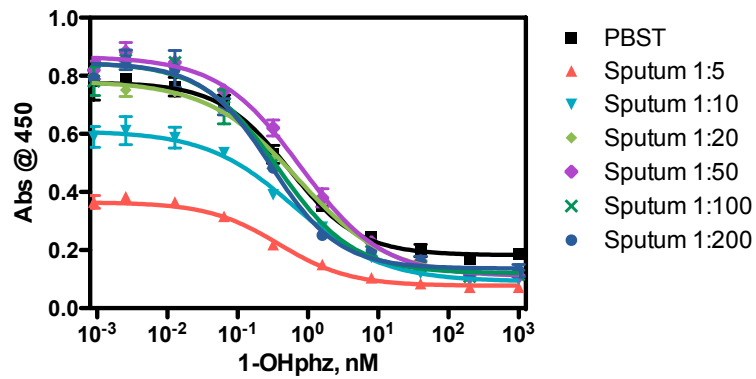
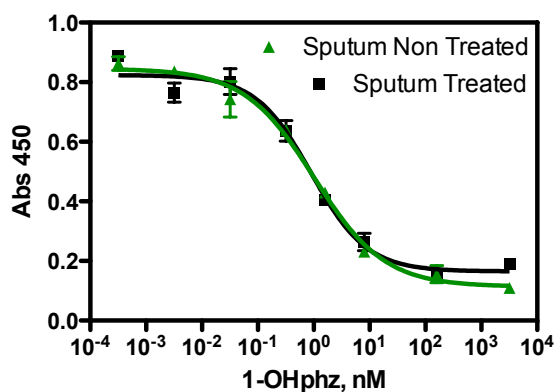


Figure 4S. Plots showing the similarities between treated (NaOH treatment to convert PYO into 1-OHphz) and non treated samples (directly diluted) in sputum. The graph shows the curves prepared in treated and non treated sputum samples diluted 20 times with PBST. As it can be observed, the procedure how you prepare the sputa sample does not influence on the sample and therefore both samples can be quantified in a single calibration curve.



REFERENCES

- (1) Vivian, D. L. *Nature* **1956**, 178, 753.
- (2) Surrey, R. A. *Organic Syntheses Collective* **1955**, 3, 753-756.

4.4 RESUM DELS RESULTATS DEL CAPÍTOL 4

S'ha desenvolupat un immunoassaig per a la detecció de 1-OHphz i PYO emprant anticossos produïts contra 1-OHphz. La similitud química de les dues estructures, permet que amb un simple tractament basic on la PYO perd el grup metil del nitrogen a la posició 5 es converteixi en 1-OHphz i per tant, quantificar els dos analits amb un únic anticòs.

Els anticossos es varen produir en conills New Zealand immunitzant el bioconjugat PC1-HCH. L'haptè PC1 és una mescla isomèrica 1:1 de l'àcid carboxílic hidroxifenazina 5, el qual va ser dissenyat i sintetitzat. De la immunització de l'haptè PC1-HCH es varen obtenir tres antisèrums etiquetats com a As230, As231 i As232, i aquests antisèrums combinats amb dos competidors de PC1-BSA conjugat mitjançant el mètode de l'èster actiu o de l'anhidrid mixta varen resultar en cinc combinacions d'assajos competitius. La combinació As230/PC1-BSA (AE), presentava una de les millors paràmetres i va ser l'escollida per als desenvolupaments posteriors.

Per poder detectar la PYO es va estudiar la reacció de desmetilació en medi basic. El protocol final consisteix en tractar les solucions de PYO amb solucions de NaOH 1M durant 20 min a temperatura ambient. La reacció va ser estudiada inicialment per HPLC-DAD i confirmada mitjanant estudis de recuperació en l'ELISA. Les mostres es dopaven a una concentració coneguda de PYO, es tractaven i posteriorment es quantificaven amb l'ELISA, obtenint per a tots els casos una bona correlació. Per tal de poder quantificar ambdós analits, les mostres es divideixen en dues parts, una es mesura directament per quantificar la 1-OHphz i l'altre es tracte amb medi bàsic abans de ser analitzada, de manera que la PYO es converteix en 1-OHphz i en l'ELISA mesurem la concentració de 1-OHphz. La diferència entre les dues mesures correspon a la concentració de PYO en la mostra.

L'assagi es va optimitzar per tal de poder quantificar les dues mostres en una única corba de calibratge. Despès de minimitzar els efectes matriu provinents d'aquest tractament de mostra i considerant la conversió quantitativa de la PYO a 1-OHphz, podem concloure que l'assaig te un LOD $0,01 \pm 0,01$ nM (N=3 dies).

Amb l'objectiu de demostrar la capacitat de l'assaig per detectar la PYO i la 1-OHphz d'origen bacterià, es varen preparar corbes de creixement de diferents soques de *P. aeruginosa* i se'n varen quantificar ambdós pigments. El medi MH necessita ser diluït 1/5 en PBST per minimitzar les interaccions no específiques del medi en l'ELISA. La producció de 1-OHphz és menor a la quantitat de PYO segregada però les

concentracions d'ambdós pigments augmenta amb el temps en les condicions estudiades.

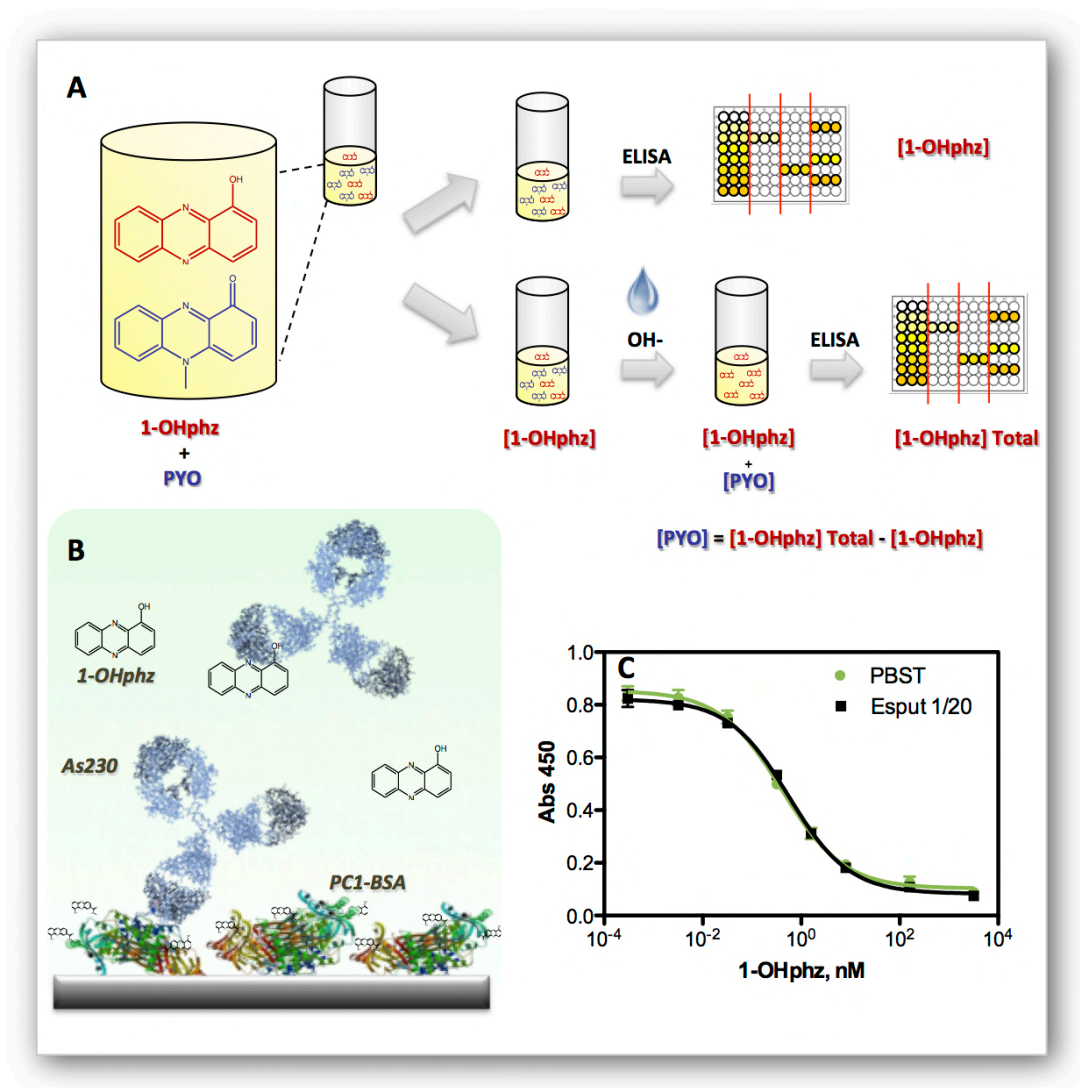


Figura 4.16 A. Representació gràfica del pretractament de mostres per poder mesurar 1-OHphz i PYO en una mateixa mostra. B. Representació del format indirecte competitiu de l'immunoassaig As230/PC1-BSA. C. Corbes de calibratge en PBST i efecte matriu de l'esput.

Degut a la rellevància de *P. aeruginosa* present en pacients amb problemes respiratoris es va decidir aplicar l'ELISA desenvolupat a la quantificació de mostres d'esput. El tractament d'aquestes mostres consisteix en primer lloc un trencament dels enllaços S-S del mucus amb DTT i posteriorment una dilució en tampó que permet minimitzar l'efecte matriu. Tenint en compte el factor de dilució aplicat, el LOD de l'ELISA en esput és de $0,60 \pm 0,01$ nM ($4,80 \pm 0,08$ nmol per Kg d'esput; N=2 dies).

Tot seguit, es varen fer estudis de recuperació, on es fortificaven mostres d'esput amb concentracions conegudes de PYO i 1-OHphz. S'obtingueren bones recuperacions, demostrant que el protocol desenvolupat pot ser aplicat a la quantificació de mostres d'esput.

Taula 4.5. Paràmetres de l'immunoassaig per a la detecció de 1-OHphz i PYO en tampó, esput i en medi MH.

Paràmetres	PBST	Esput 1/20 ^a	Müller Hinton 1/5
A _{max}	0,75 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,82 ± 0,05
A _{min}	0,18 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,03
Pendent	0,87 ± 0,04	-0,71 ± 0,01	-0,88 ± 0,14
IC ₅₀ , nM	0,53 ± 0,04	11,2 ± 0,03 (89,6 ± 8,24) ^b	4,75 ± 1,59
LOD, nM	0,01 ± 0,01	0,60 ± 0,01 (4,80 ± 0,08) ^b	0,32 ± 0,23
R ²	0,992 ± 0,003	0,997 ± 0,003	0,981 ± 0,009

^a Les concentracions han estat multiplicades pels factors de dilució aplicat per obtenir el valor de detectabilitat en la mostra original. ^b Concentracions expressades en nmol de 1-OHphz per Kg d'esput.

Per últim, l'assaig es va intentar implementar en mostres reals de pacients colonitzats per *P. aeruginosa* però no es va poder detectar PYO ni 1-OHphz en les mostres examinades.

4.5 PRINCIPALS APORTACIONS DEL TREBALL DESCRIT EN D'AQUEST CAPÍTOL 4

Les principals aportacions d'aquest capítol són les següents:

- És la primera vegada que s'obtenen anticossos contra la 1-OHphz i que s'apliquen a la detecció de 1-OHphz i PYO. Per a l'obtenció dels anticossos contra la 1-OHphz va ser necessari el disseny i síntesi d'un haptè d'immunització (PC1) el qual es va conjugar a la proteïna HCH per obtenir els immunògens desitjats.
- S'ha desenvolupat una eina ràpida, sensible, específica i cost-efectiva per a la detecció de la piocianina i 1-OHphz. Si bé a la bibliografia trobem altres mètodes per a la detecció de d'aquests pigments cap d'ells reuneix les qualitats que presenta l'ELISA. Per un costat trobem tècniques com l'HPLC o la GC^{172,213} que són tècniques laborioses i presenten dificultats per a l'anàlisi de mostres biològiques o per un altre costat, sensors amb una sensibilitat de l'orde de l'ELISA^{215,216,218}, amb la possibilitat de ser aplicats a mostres biològiques però no presenten cap element de bioreconeixement específic i

per tant, altres elements presents en la mostra podrien donar lloc a falsos positius.

- L'ELISA desenvolupat s'ha pogut aplicar per a la quantificació de sobrenedants de cultius cel·lulars. S'ha quantificat 1-OHphz i PYO provinent de diferents soques de *P. aeruginosa* en medi MH.
- Com a prova de concepte, l'ELISA desenvolupat s'ha aplicat a mostres d'esput. S'ha minimitzat l'efecte matriu de la mostra amb un simple tractament de trencament dels enllaços disulfur de l'esput i dilució que permet mesurar aquests compostos en esput de manera ràpida i fàcil. A més els estudis d'exactitud mostren que, tot i el tractament, l'ELISA és que capaç de quantificar de forma força acurada el contingut de PYO en aquestes mostres complexes.

S'ha aconseguit, doncs, posar a punt un eina de diagnòstic ràpida, específica per a la detecció de PYO i 1-OHphz. Els ELISAs en microplaca presenten l'avantatge de poder processar un gran número de mostres i per tant ser útils per al cribatge. En el cas de l'esput, els límits de detecció aconseguits tant en tampó com en matriu són molt bons, assolint valors significativament inferiors als continguts de PYO reportats per mostres d'esput de pacients malalts. A més a més, l'immunoassaig es podria aplicar a altres matrius que siguin de rellevància en infeccions causades per *P. aeruginosa*. El treball desenvolupat també obre les portes a una possible aplicació de l'immunoassaig a un dispositiu tipus PoC, en format de tira reactiva o immunobiosensor.

Per altra banda, el desenvolupament d'una tècnica per a la detecció de la PYO té un ampli ventall d'aplicacions a més del nostre objectiu inicial, el diagnòstic de *P. aeruginosa*. La tècnica desenvolupada pot ser de gran interès en altres tipus d'estudis on es requereixi la monitorització i/o quantificació de la PYO com ara l'avaluació de nous fàrmacs contra *P. aeruginosa*, estudis de toxicitat, eina per a l'estudi de la rellevància o funcions bàsiques implícites del pigment o monitorització de la PYO en les infeccions de *P. aeruginosa* com a possible predicció de l'evolució del pacient.

4.6 MATERIALS I MÈTODES

En aquest apartat es descriuen els materials i mètodes emprats per a la síntesi de l'haptè PC1 i per a les corbes de creixement de *P. aeruginosa* que no es recullen en les publicacions dels apartats 0 i 4.3.6.

Reactius i immunoreactius

L'antisèrum As230, l'haptè PC1-BSA i la 1-OHphz han sigut motiu d'estudi d'aquesta tesi doctoral i la seva preparació ha estat prèviament descrita (vegeu publicació X, apartat 4.3.6). Els reactius químics emprats foren adquirits a la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Les soques DKN263 i DKN330 han estat facilitades per la Dra. Newman de l'Institut de Tecnologia de Califòrnia (Caltech, Pasadena, CA, EEUU).

Tampons i dissolucions

Per a la realització dels immunoassajos es varen utilitzar els següents tampons:

PBS és tampó fosfat 10 mM amb una solució de NaCl 140 mM a pH 7,5. PBST és tampó PBS amb 0,05% de Tween[®] 20. 10X PBS és PBS 10 vegades concentrate. Tampó carbonat/bicarbonat és Na₂CO₃/NaHCO₃ 0,05M a pH 9. Tampó citrat és citrate de sodi 40 mM a pH 5,5. La solució substrat conté 0,001% TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) i H₂O₂ al 0,004% en tampó citrat.

Instrumentació i altres

Les TLC es va realitzar en làmines d'alúmina recobertes de 0,25 mm de sílica gel 60 F254 (Merk, Darmstadt, Alemanya) i la separació dels diferents compostos sintetitzats es va realitzar mitjançant columnes de cromatografia de sílica gel (tamany de por 60 Å, 230-400 mesh particle size). Els espectres de NMR ¹H es varen realitzar en un espectròmetre Varian (Palo Alto, Califòrnia, USA) Unity-300 (300 MHz) o en un espectròmetre Varian Inova 500 (500 MHz).

Les microplaques de poliestirè es varen obtenir de Nunc (Maxisorp, Roskilde, Dinamarca). El rentat de les plaques es va realitzar amb un rentador de plaques ELx405 HT (BioTek, Winooski, VT). Les absorbàncies o OD es varen llegir usant un espectròmetre SpectamaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a una longitud d'ona fixe, 450 nm per als immunoassajos i 600 nm per les corbes de creixement bacteria. Les corbes de calibració de l'ELISA es varen analitzar mitjançant una equació logística de quatre paràmetres amb el software de GraphPad PrismTM (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Les corbes estàndards es varen ajustar a una equació logística de quatre paràmetres regint-se per la fórmula: $Y = [(A-B)/1 -$

$(x/C)^D + B$, on A és el senyal màxim, B és el senyal mínim, C és la concentració produint el 50% del senyal màxim, i D és la pendent al punt d'infecció de la corba. La IC₅₀ i la IC₉₀ es varen calcular com a la concentració corresponent d'analit per inhibir l'assaig obtenint el 50 o 90% d'absorbància respectivament. El pH dels tampons i solucions s'han mesurat amb un pH-metre 540 GLP.

3-Metoxi-*o*-benzoquinona (2)

En un matràs de tres boques (100 mL) provist d'un núcli magnètic, un embut d'addició de pressió compensada i un tub de CaCl₂ es va dissoldre la 3,4,5,6-tetracloro-1,2-benzoquinona (3,68 g, 14,9 mmol) en éter anhidre (50 mL). Seguidament, una solució de 1,2-dihidroxibenzè (2,00 g, 14,3 mmol) en éter anhidre (10 mL) es va afegir gota a gota sobre la solució anterior fent ús de l'embut d'addició compensada. Un cop acabada l'addició, es va refredar la solució – 20°C en un bany de gel i sal durant 15 min. Els cristalls es varen filtrar en una placa filtrant del n. 4 i es varen rentar amb éter anhidre fred, obtenint un rendiment del 75% (1,50 g).

NMR ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 3,79 (s, 3H, CH₃) 5,92 (dd, 1H_{Ar}, J=0,6 Hz, J=7,2 Hz) 6,09 (dd, 1H_{Ar}, J=1,2 Hz, J=10,2 Hz) 7,02 (dd, 1H_{Ar}, J=7,2 Hz, J=10,2 Hz).

1-Metoxifenazina (4)

En un maraç de tres boques (100 mL) provist de núcli magnètic, un embut d'addició de pressió compensada i un tub de CaCl₂, es va dissoldre la 3-metoxi-*o*-benzoquinona (2) (1,30 g, 9,4 mmol) en CH₂Cl₂ anhidre (15 mL). Seguidament, es va afegir gota a gota una solució de 1,2-diaminobenzè (3) (0,79 g, 7,3 mmol) dissolta en una mescla de CH₂Cl₂ anhidre:àcid acètic (10 mL : 6 mL) i es va deixar evolucionar la reacció a temperatura ambient durant 1,5 h. A continuació, el cru de reacció es va rentar tres vegades amb una solució de NaOH al 5% i després tres vegades més amb H₂O. Després d'assecar la fase orgànica amb MgSO₄ anhidre, es va filtrar i es va concentrar a sequedat. Es va obtenir un sòlid marró que es va purificar mitjançant una columna de sílica gel usant com a fase mòvil una mescla AcOEt: hexà (1:1). Les fraccions corresponents a la 1-metoxifenazina (4) es varen rotavaporar, obtenint un rendiment del 41% (700 mg).

NMR ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm : 4,19 (s, 3H, CH₃) 7,09 (d, 1H_{Ar}, J=7,5 Hz) 7,77 (t, 1H_{Ar}, J=9 Hz) 7,84 (m, 3H_{Ar}) 8,24 (dd, 1H_{Ar}) 8,40 (dd, 1H_{Ar}).

1-Hidroxifenazina (5, 1-OHphz)

Ruta sintètica A

El BBr₃ (8 mL, 5,6 mmol) es va afegir gota a gota a una solució de 1-metoxifenazina (4) (340 mg, 1,61 mmol) en CH₂Cl₂ anhidre (15 mL), a temperatura ambient i sota atmosfera d'argó. La reacció es va mantenir en agitació durant 8 h i transcorregut aquest temps, es varen afegir unes gotes d'H₂O per comprovar que tot el BBr₃

s'havia consumit. Es va rentar la fase orgànica en aigua (3 x 20 mL) i seguidament amb NaOH 1 M (3 x 20 mL). Es va neutralitzar la fase aquosa amb HCl 1 M i es va extreure amb CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). Després de secar la fase orgànica amb MgSO₄ anhidre, es va filtrar i es va concentrar a sequedat. Es va obtenir un sòlid groc corresponent a la 1-OHphz (5) amb un 36% de rendiment (114 mg).

Ruta sintètica B²²²

En un ampolla de vidre transparent es va dissoldre metansulfonat de *N*-metilfenazina (11) (500 mg, 2,5 mmol) en H₂O (400 mL) i es va exposar a la llum solar durant 3 dies sense tancar l'ampolla (aproximadament 24 h de llum). A continuació, es va afegir una solució de NaOH 8 M (5 mL) i es va agitar durant 16 h a temperatura ambient. Es va filtrar la mostra i es va extreure amb éter. La fase aquosa es va acidificar amb àcid acètic i es va extreure amb éter (3 x 300 mL). Després de secar la fase orgànica amb MgSO₄ anhidre, es va filtrar i es va concentrar a sequedat. Es va obtenir la 1-OHphz amb un 72% de rendiment (231,7 g).

NMR ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm : 7,20 (dd, 1H_{Ar}, J=1,5 Hz, J=7,4 Hz) 7,69 (dd, 1H_{Ar}, J=1,5 Hz, J=8,7 Hz) 7,78 (dd, 1H_{Ar}, J=7,2 Hz, J=8,7 Hz) 7,94 (m, 2H_{Ar}) 8,21 (m, 1H_{Ar}) 8,29 (m, 1H_{Ar}).

Metansulfonat de *N*-metilfenazina (11)

En un matràs de fons rodó (100 mL) provist amb un núcli magnètic es va escalfar PhNO₂ (25 mL) a 130°C. Seguidament, es va afegir (CH₃)₂SO₄ (7 mL) i es va deixar agitant durant 5 min ente 105-110°C. A continuació, es va deixar atemperar la solució, es varen filtrar els cristalls taronges en una placa filtrant del n. 4 i es va obtenir el producte amb un 70% de rendiment (6 g).

NMR ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm : 3,67 (s, 3H, S-CH₃) 4,79 (s, 3H, N-CH₃) 8,27 (t, 2H_{Ar}, J=8,1 Hz) 8,48 (t, 2H_{Ar}) 8,57 (d, 2H_{Ar}, J= 8,7 Hz) 8,68 (d, 2H_{Ar}, J=9,3 Hz).

1-Hidroxi-5-metilfenazina (PYO)

En un matràs (10 mL) provist d'un núcli magnètic i tub de CaCl₂ es va dissoldre 1-OHphz (5) (300 mg, 1,5 mmol) en (CH₃)₃SO₄ (1,3 mL) i es va escalfar a 100°C durant 10 min. A continuació, es va refredar el matràs de la reacció i una cop atemperat es va afegir l'éter (10 mL). Es va filtrar i es va afegir H₂O (5 mL) i una solució de NaOH al 10% (1 mL). Seguidament, la fase aquosa es va extreure amb CH₃Cl. La fase orgànica es va secar amb MgSO₄ anhidre, es va filtra i es va concentrar a sequedat. Es va obtenir un residuo cristalí de color blau amb un 93% de rendiment (300 mg).

NMR ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm : 4,01 (s, 3H, N-CH₃) 6,50 (d, 1H_{Ar}, J=8,4 Hz) 6,58 (d, 1H_{Ar}, J= 8,4 Hz) 7,71 (dd, 1H_{Ar}, J=8,2 Hz, J=8,2 Hz) 7,88 (d, 1H_{Ar}, J=8,2 Hz) 8,05 (dd, 1H_{Ar}, J=8,4 Hz, J=8,4 Hz) 8,05 (dd, 1H_{Ar}, J=8,2 Hz, J=8,2 Hz) 8,30 (d, 1H_{Ar}, J=8,2 Hz).

Cultius de P. aeruginosa

Aquests experiments els varen realitzar els col·laboradors clínics del projecte NanoBioSepRes de l'HGTiP.

En primer lloc es va preparar un pre-cultiu de bacterià inoculant una colònia fresca en un erlenmeyer amb medi MH (20 mL) i es va deixar tota la nit a 30°C amb agitació. El segon dia, es va inocular medi MH (100 mL) amb el pre-cultiu (1 mL) del dia anterior. A partir d'aquest moment es va llegir densitat òptica a 600 nm en intervals d'una hora (Temps 0 correspon a la lectura al inocular amb el pre-cultiu). Per a cada hora es va apartar una alíquota del cultiu (2 mL) va centrifugar per obtenir el pellet de cèl·lules (300 G x 5 min), i es va separar el sobrenedant per ésser congelat a -20°C.

Avaluació de l'efecte matriu del medi MH en l'ELISA As230/PC1-BSA

Es varen preparar corbes estandard de 1-OHphz amb medi MH a diferents dilucions (desde 1/2 a 1/20) amb PBST. Les corbes es varen analitzar amb l'ELISA As230/PC1-BSA (vegeu procediment *1-OHphz ELISA [As230/PC1-BSA (AE)]* descrit en l'apartat experimental de la publicació X) per comparar el paral·lelisme amb la corba estandard de PBST.

Comparativa de l'efecte matriu del medi MH tractat i no tractat en l'ELISA As230/PC1-BSA

Es varen prepara dues corbes estàndards de 1-OHphz amb medi MH tractat i no tractat (vegeu procediment *Sample treatment* descrit en la part experimental de la publicació X) diluït 1/5 en PBST. Tot seguit, les corbes es varen analitzar amb l'ELISA As230/PC1-BSA (vegeu procediment *1-OHphz ELISA [As230/PC1-BSA (AE)]* descrit en l'apartat experimental de la publicació X) per comparar el paral·lelisme entre les dues corbes.

5 Conclusions

A continuació es recullen les conclusions que s'extreuen de la investigació realitzada en aquesta tesi doctoral, que ha abordat el desenvolupament d'assajos immunoquímics per a la detecció de *S. aureus* (5.1) i d'infeccions causades per *P. aeruginosa* (5.2).

5.1 ESTABLIMENT D'UN PROCEDIMENT IMMUNOQUÍMIC PER A LA DETECCIÓ DE *Staphylococcus aureus* EN MOSTRES CLÍNIQUES

- Els immunoreactius desenvolupats contra el pont de cinc glicines de *S. aureus* han demostrat tenir un elevat potencial per a la detecció de *S. aureus* i han permès el desenvolupament d'assajos immunoquímics, robustos i reproduïbles.
- El fragment peptídic constituït per dos *stem peptides* i un pèptid pont de cinc glicines característic de *S. aureus*, unitat que es repeteix a l'estructura del PG d'aquest bacteri, ha resultat ser un excel·lent epítot diana per a la producció d'anticossos específic contra aquest bacteri.
- El disseny d'haptè realitzat que incorpora un residu de Cys a l'extrem terminal d'un dels *stem peptides* ha permès generar anticossos d'alta afinitat contra aquest epítot, que a més han resultat ser útils per detectar-ho també en el conjunt de l'estructura del PG i del microorganisme.
- Tots dos haptens d'immunització, *PSau5* i *PSau7*, generats contra els fragments terminals (DAIa-DAIa) o doblement lligats a d'altres unitats (tan sols una DAIa) han mostrat ser igualment adients per produir anticossos capaços de reconèixer el bacteri, al qual cosa indicaria que el nombre de fragments terminals es força significatiu en la paret bacteriana, o bé que aquest fragment es troba més accessible. En qualsevol cas, tots dos haptens han generat assajos amb les mateixes característiques analítiques pel que fa a la detectabilitat i l'especificitat.
- Pel que fa al desenvolupament de l'immunoassaig competitiu, els resultats obtinguts indiquen que l'heterologia de l'haptè de competició no té un paper important en aquest cas, ja que tots els bioconjugats preparats per ser usats com a competidors van proporcionar assajos molt similars des d'un punt de vista analític.
- L'ús dels pèptids sintètics *PSau5* i *PSau7*, corresponents als epítots seleccionats, com a referències per calibrar l'assaig ha mostrat ser una millor estratègia que l'ús del mateix PG, per assegurar la reproduïbilitat i la fiabilitat de l'assaig. Això es degut a la puresa i homogeneïtat de la referència de tipus sintètic, que no es pot assegurar en el cas del PG procedent d'extractes de

bacteri. A més, els resultats demostren que existeix una bona correlació entre els equivalents d'immunoreactivitat del PSau7 (PSau7 IR equiv.) i els CFU mL⁻¹ de *S. aureus*, la qual cosa dóna suport l'ús d'aquests pèptids com a calibradors en cas de desenvolupar una eina diagnòstica.

- S'ha demostrat que el tractament amb TFMSA millora la disponibilitat pel reconeixement immunoquímic dels pèptids de la paret bacteriana. Això s'ha posat en evidència tant per a extractes de PG com en mostres de *S. aureus*. A més els resultats obtinguts en tampó ha estat corroborats pels aconseguits quan els mateixos estudis s'ha fet en matrius biològiques, concretament de BAL i BAS. Així doncs, aquest tractament permet incrementar la detectabilitat de l'assaig en gairebé 3 ordres de magnitud i s'assoleix una LOD de 10⁴ CFU mL⁻¹ en suspensions bacterianes preparades en tampó. En mostres clíniques la detectabilitat assolida és lleugerament inferior que en tampó (10⁵ CFU mL⁻¹ per BAS i 10⁶ CFU mL⁻¹ per BAL) però encara millor que si no s'aplica el tractament.
- L'ELISA As291/PSau3-BSA de *S. aureus* pot constituir una excel·lent eina per al cribratge de pacients infectats per aquest bacteri així com també per a la caracterització de diferents batchs d'extractes de PG.

5.2 ESTABLIMENT D'UN PROCEDIMENT IMMUNOQUÍMIC PER A LA DETECCIÓ DE *Pseudomonas aeruginosa* EN MOSTRES CLÍNIQUES

- Els immunoreactius desenvolupats contra la 1-OHphz han demostrat ser altament específics per aquesta molècula i han permès el desenvolupament d'assajos immunoquímics específics per a la detecció d'infeccions causades per *P. aeruginosa*.
- La incorporació d'un grup carboxílic a la posició 4 o 5 de la 1-OHphz per obtenir l'haptè PC1 i generar anticossos d'alta afinitat contra la 1-OHphz, gràcies al seu acoblament covalent a una macrobiomolècula, ha permès que es produís una resposta immune en l'animal hoste.
- La quantificació de PYO és possible gràcies a un tractament ràpid i senzill que aconsegueix convertir en 1-OHphz de manera quantitativa. Per tant, totes dues molècules poden ser quantificades simultàniament en una mateixa mostra.
- Tot i la complexitat de les mostres d'esput, s'ha aconseguit implementar l'assaig per l'anàlisi d'aquest tipus de mostres biològiques, s'ha assolit una detectabilitat adient i uns resultats fiables. A causa de la complicada manipulació de l'esput, s'ha establert un protocol amb DTT que permet trencar l'estructura mucolítica. El LOD assolit en esput és de 0,60 ± 0,01 nM

($4,80 \pm 0,08$ nmols Kg⁻¹ esput), lleugerament superior al assolit en tampó ($0,01 \pm 0,01$ nM) però significativament rellevant per a la seva implementació en l'àmbit clínic.

- L'assaig també ha estat aplicat a la quantificació de PYO i 1-OHphz en mostres de sobrenedants provinents de medi de cultiu *Müller Hinton*. Els LOD assolits en aquest medi han estat de l'ordre del nM i s'ha demostrat la quantificació de 1-OHphz i PYO excretats per *P. aeruginosa* en el decurs del seu creixement.
- L'ELISA As230/PC1-BSA desenvolupat per a la detecció de 1-OHphz i PYO és una potencial eina de cribratge per a la detecció d'infeccions causades per *P. aeruginosa*.

5.3 CONCLUSIONS GENERALS

Els immunoactius desenvolupats per a la detecció d'infeccions causades per *S. aureus* i *P. aeruginosa* han demostrat tenir un elevat potencial per a la detecció de les respectives bacteries en mostres biològiques emprant immunoassajos de tipus ELISA.

La tècnica d'ELISA desenvolupada per a la detecció d'infeccions causades per patògens aporta nous avantatges respecte a les tècniques habituals. Els anticossos emprats s'han caracteritzat detingudament i se'n coneix detalladament l'especificitat. És una tècnica efectiva de baix cost i de fàcil implementació en un laboratori clínic.

Els immunoreactius desenvolupats es podrien aplicar a d'altres formats d'immunoassaig si els objectius que es volguessin abordar fossin lleugerament diferents als plantejats en aquesta tesi doctoral. Un format de tipus tira reactiva ens permetria obtenir un resultat en menys temps i la lectura del resultat es podria fer a ull nu. Per altra banda, els immunoreactius també es podrien aplicar en un sensor en cas de necessitat d'obtenció de dispositius miniaturitzable, portables i amb possibilitat de millora de la detectabilitat.

Per l'objectiu d'aquesta tesi, els immunoreactius desenvolupats han estat aplicats a tècniques de detecció de patògen però la tècnica desenvolupada també podria tenir altres aplicacions dins del camp de la biomedicina, com ara l'avaluació de fàrmacs contra els bacteris corresponents o la caracterització d'antígens.

**6 Annex I: Avaluació de l'ús terapèutic de l'As230 produït
contra la 1-OHphz com a potencial inhibidor del *quorum
sensing***

Al 2013, gràcies a una beca BE-DGR de la Generalitat de Catalunya va ser possible una estada de recerca de quatre mesos en el grup del Prof. Kim Janda al The Scripps Research Institute (TSRI). El principal objectiu de l'estada era complementar el treball de recerca obrint noves perspectives relacionades amb l'ús terapèutic dels anticossos que, com alguns dels produïts en aquesta tesi, poden interaccionar amb el sistema del *quòrum sensing* (QS). En aquest context, el grup del Prof. Kim Janda ha demostrat un ampli coneixement recolzat per un gran nombre de publicacions relacionades amb el mateix àmbit. Per altre banda, tal com s'ha descrit al Capítol 4, en aquesta tesi doctoral es va assolir amb èxit la producció d'anticossos específics contra la PYO i la 1-OHphz, dos factors de virulència específics de *P. aeruginosa* i, que a més, són considerats factors claus en el sistema del QS d'aquest bacteri (vegeu apartat 4.1.2).

La piocianina, es un dels factors de major virulència d'aquest bacteri^{160,177} i la seva producció està regulada pel QS¹⁹¹. S'ha demostrat que la toxicitat de PYO i 1-OHphz implica també la interferència amb el sistema immunològic mamífer i efectes apoptòtics de neutròfils i altres cèl·lules^{162,163}.

6.1 Objectius i estratègia

En base a tot l'anteriorment esmentat es va proposar com a objectiu per aquesta estada predoctoral l'avaluació dels anticossos contra la 1-OHphz com a potencials agents terapèutics. Aquest objectiu requeria abordar una sèrie d'objectius específics en primer lloc:

- 1) Purificació per immunoafinitat dels antisèrums a fi d'obtenir únicament els anticossos específics.
- 2) Establiment d'un assaig de citotoxicitat emprant cèl·lules mamàries, per avaluar la funció citotòxica d'aquests factors de virulència, mitjançant microscòpia i tests de citotoxicitat adients.
- 3) Avaluació la capacitat de l'anticòs anti- 1-OHphz per neutralitzar els efectes tòxics que les molècules PYO i la 1-OHphz tenen sobre les cèl·lules mamàries.

6.2 Resultats i discussió

6.2.1 Preparació i caracterització d'un suport sòlid

L'anticòs contra la 1-OHphz és un anticòs policlonal, però el seu possible ús terapèutic requereix en primer lloc immunopurificar l'anticòs per aïllar únicament la fracció d'IgGs específiques. Per aquest motiu es va abordar la preparació d'un immunosorbent usant com a suport sòlid columnes HiTrapTM NHS-activated HP (GE

Healthcare). Es tracta de columnes disponibles comercialment pre-empaquetades amb safarosa (agarosa molt entrecreuada, 6% aprox.) activada amb grups NHS (10 μM de grups NHS mL^{-1} de medi) que permeten la unió de lligands a través de les seves amines primàries. L'antigen (PC1-BSA, prèviament preparat i caracteritzat, vegeu capítol 4) es va unir covalentment a la safarosa a través dels grups amino de la lisina de la proteïna formant un enllaç amida estable. La quantitat d'antigen unit al suport es va calcular comparant la mesura d'absorbància a 280 nm de la solució de l'antigen abans de ser carregat a la columna HiTrap i la primera solució de rentat després de l'etapa d'acoblament. El rendiment obtingut va ser del 85% d'acoblament, el que proporcionava una capacitat teòrica de la columna d'aproximadament 15 mg d'anticòs específic.

6.2.2 Purificació de l'As230 per immunoafinitat

L'objectiu de l'elució és tenir una desorció eficient, sense que es produeixi una desnaturalització de l'anticòs per preservar-ne la seva immunoreactivitat. Un cop s'hagi produït la càrrega d'anticòs, el complex Ab230-PC1-BSA està format per forces electrostàtiques, enllaços d'hidrogen secundàries i forces de Van der Waals. Per desorbir l'anticòs s'han de trencar aquests enllaços i, d'acord amb la literatura²⁶⁵ els eluents més comuns són tampons àcids o bàsics, solucions d'alta força iònica, dissolvents orgànics i agents desplaçadors.

Es va optar per un tampó de dissociació de glicina-HCl 0,1 M a pH 2,5, i va ser avaluat per tal d'aconseguir desorbir els anticossos amb el mínim volum possible i amb una alteració també mínima de l'activitat de l'anticòs. Amb aquestes condicions fixades es va procedir a fer passar la solució d'antisèrum (prèviament purificat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45%, vegeu part experimental descrita en apartat 3.7) i es va quantificar la quantitat total d'IgGs immobilitzada mesurant la diferència en l'absorbància a 280 nm entre la solució carregada i la fracció no retinguda a la columna, un cop s'havia passat la solució. Els resultats obtinguts varen correlacionar perfectament amb les expectatives teòriques, ja que per cada 1 mL carregats havien quedat immobilitzades aproximadament 10 mg d'IgG específica, la qual cosa concorda amb el fet de que aproximadament un sèrum policlonal té un 10% de IgGs específiques.

6.2.3 Avaluació de la citotoxicitat de la 1-hidroxifenazina en cèl·lules mamàries

Aquests treball es va fer amb dues línies cel·lulars, macròfags RAW 264,5 i fibroblasts A549. Es van seleccionar macròfags perquè és coneguda l'acció citotòxica que la PYO exerceix sobre aquestes cèl·lules¹⁷³. I els fibroblasts perquè era una línia cel·lular disponible al laboratori i per comprovar si les fenazines també mostraven acció citotòxica com si que s'havia observat amb les AHLs²⁶⁶.

Quan les cèl·lules s'incubaven en presència de 1-OHphz, l'efecte citotòxic es podia començar a observar al microscopi al cap de dues hores de l'addició, les cèl·lules es reproduïen en menor quantitat i adoptaven formes poc convencionals. Al mateix temps es determinava la viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig de proliferació cel·lular MTT d'acord amb les instruccions del fabricant (Promega). Aquest assaig es basa amb la reducció del salt de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2*H*-tetrazol (MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) per produir formazan ((*E,Z*)-1-(4,5-dimetiltiazol-2il)-3,5-difenilformazan), un compost blau, del que se'n pot mesurar l'absorbància a 570 nm i és directament proporcional al nombre de cèl·lules viables (vegeu Figura 6.1). Tot i la controvèrsia entorn de la localització i l'agent reductor que permet que la reacció tingui lloc, diversos estudis apunten que la reacció tindria lloc a nivell mitocondrial i el NADH seria l'agent reductor principal²⁶⁷.

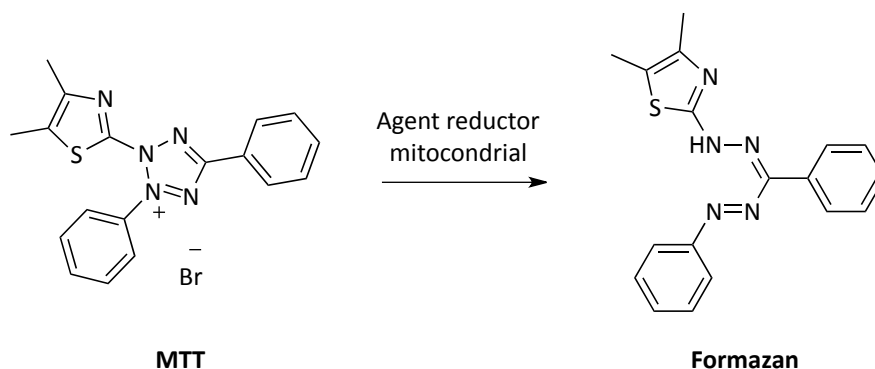


Figura 6.1 Reacció de reducció del salt de MTT per donar formazan.

Les imatges de la Figura 6.2 mostren la resposta dosis-depenent de citotoxicitat de les cèl·lules tractades amb 1-OHphz en les cèl·lules RAW 264,5 i A549. Es pot apreciar com l'efecte de toxicitat és major a més quantitat de 1-OHphz per ambdues línies cel·lulars. L'efecte es veu més acusat per les RAW 264,5, on per la mateixa quantitat de 1-OHphz les cèl·lules adopten una morfologia més allunyada de la forma estàndard. Els gràfics de la Figura 6.3 mostren els valors quantificats de viabilitat mitjançant l'assaig MTT, on podem apreciar el major grau de mortalitat en les cèl·lules RAW 264,5 respecte les A549. El mateix comportament citotòxic havia estat descrit pel la lactona de homoserina 3-oxo-C₁₂-HSL (C12; vegeu apartat 4.1.2),

producte del QS de *P. aeruginosa*, que s'ha afegit als experiments com a control positiu^{268,269}.

Com a conseqüència d'aquests resultats, els subseqüents estudis es van fer únicament amb la línia cel·lular RAW 264,5, degut a la major sensibilitat mostrada per la 1-OHphz. A més, es va fixar una concentració de 50 µM, que és la que produeix la mort d'aproximadament el 50% de les cèl·lules. Comparant amb el control positiu C12, la 1-OHphz provoca una mortalitat semblant en les cèl·lules A549, mentre que en les RAW 264,5 la C12 és més citotòxica que la 1-OHphz.

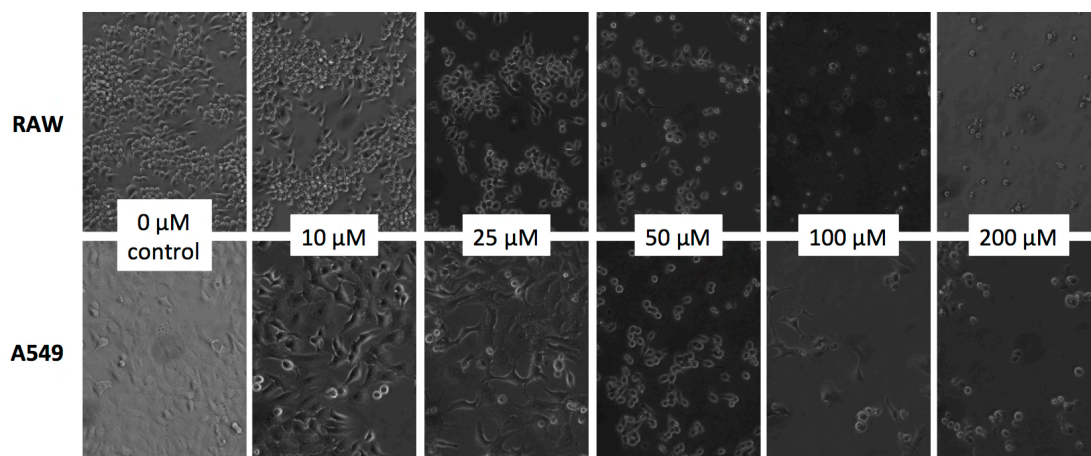


Figura 6.2 Imatges de microscòpia de la toxicitat dosi depenent de la concentració de 1-OHphz de les cèl·lules RAW 264,5 (imatges superiors) i A5491 (imatges inferiors) després de 3 dies de l'addició de la 1-OHphz.

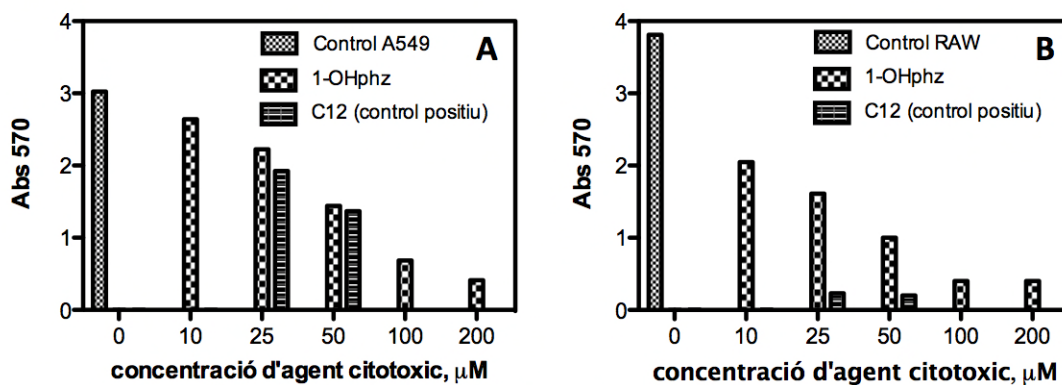


Figura 6.3 Resultats de l'assaig de proliferació MTT en les cèl·lules A549 (A) RAW 264,5 (B) a diferents concentracions de 1-OHphz després de tres dies de l'addició del compost. En ambdós casos, s'ha posat el control de cèl·lules corresponent a la no addició de 1-OHphz i un control positiu de l'addició de 3-oxo-C₁₂-HSL (C12), un compost que també és citotòxic.

Fins aleshores, els assajos s'havien realitzat en volums de 1 mL. Tanmateix, pensant les quantitats d'Ab230 que s'haurien d'utilitzar era necessari treballar amb un volum d'assaig més reduït. La 1-OHphz que s'afegeix està dissolta en DMSO, i per tant, el fet de reduir el volum també condicionava a realitzar un estudi previ del

percentatge de tolerància de les cèl·lules al DMSO. En els estudis anteriors el volum total de 1-OHphz dissolt en DMSO que s'havia afegit representava un 0,5% del volum total. L'estudi es va realitzar comparant el comportament de tres volums de treball diferents, 1 mL, 200 μ L i 100 μ L. Com queda demostrat en la Figura 6.4, les cèl·lules són sensibles al DMSO, però el 0,5% la viabilitat cel·lular és encara pràcticament igual al 0%. En vistes dels resultats, vam assumir que no podíem incrementar més el % de DMSO de l'assaig. Com es pot apreciar en la gràfica 6.4, els tres volums d'assaig estudiats donen resultats pràcticament iguals de viabilitat cel·lular i per tant, es decideix treballar a volums d'assaig de 100 μ L per als futurs experiments.

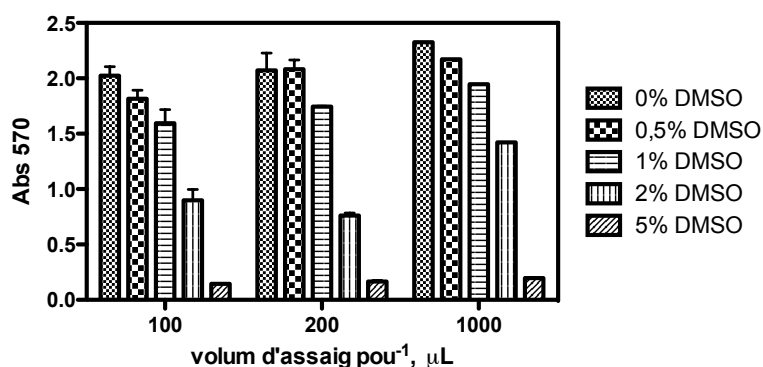


Figura 6.4 Estudi de la tolerància del % de DMSO de les cèl·lules RAW 264,5 a diferents volums d'assaig (100 μ L, 200 μ L i 1000 μ L).

6.2.4 Avaluació de la capacitat inhibidora de l'Ab230 en assajos de citotoxicitat en cèl·lules mamàries en presència de 1-OHphz

Per a l'assaig de citotoxicitat les cèl·lules RAW 264,5 es van incubar en microplaques de cultiu cel·lular i passades les 2 h, el medi es va retirar i es va addicionar l'Ab230 dissolt en medi de cultiu a dos concentracions diferents (10 i 5 mg mL^{-1} (66 i 33 μM , respectivament) seguit de l'addició del 1-OHphz (50 μM de concentració final). Les cèl·lules RAW es van tornar a incubar durant 24 hores amb atmosfera humida i passat aquest temps, es va observar que el control negatiu d'anticòs (on no s'havia addicionat 1-OHphz) s'observava un efecte altament tòxic sobre les cèl·lules, evidenciat una disgregació pràcticament immediata de les cèl·lules al entrar en contacte amb l'Ab230. Aquest fet es va atribuir a la presència d'algun tipus de contaminant, present en la solució de l'anticòs, que estaria produint efecte perjudicial per a les cèl·lules, el que apuntava a la necessitat de purificar més l'anticòs.

Per eliminar aquests possibles agents en una primera instància es va fer servir columnes HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare), pre-empaquetades amb

MabSelect SuRe, un tipus de proteïna A pensada principalment per a la purificació del medi de cultiu amb anticossos monoclonals, ja que sol ser el més habitual en aquests tipus de treballs però també eficient per pAb. Amb aquesta etapa addicional vam pensar que aconseguiríem millorar la qualitat de la puresa de l'anticòs. Un cop purificat, es va repetir l'assaig de citotoxicitat amb les cèl·lules RAW 264,5 i tot i que les cèl·lules semblava que mostraven una major tolerància a l'anticòs purificat, ja que es tardava més en observar mortalitat cel·lular, la toxicitat no desitjada seguia sent altament apreciable. I passats 30 minuts de l'addició de l'anticòs les cèl·lules s'havien disgregat per complet. La Figura 6.5 mostra els valors obtinguts en la quantificació amb l'assaig de viabilitat cel·lular MTT, on es pot apreciar que l'anticòs exerceix un efecte més tòxic que no pas el que provocat per l'addició de 1-OHphz. Vegeu també les imatges de la Figura 6.6 A (control), B (citotoxicitat provocada per 1-OHphz) i C (addició de l'Ab230) de la Figura 6.5.

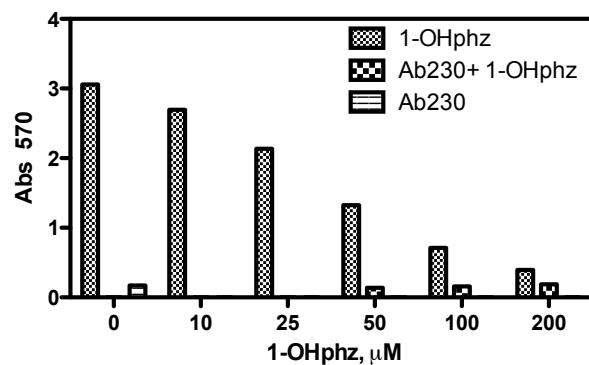


Figura 6.5 Resultats de l'assaig de viabilitat cel·lular MTT dels efectes d'addició de 1-OHphz i l'Ab230 en cèl·lules RAW 264,5 després de 30 minuts de d'assaig.

Tot i la puresa de l'anticòs, moltes vegades aquests efectes observats venen provocats per la contaminació amb endotoxines (pirògens) sobretot si el producte ha estat manipulat en ambients no estèrils. Els pirògens solen ser molècules d'alt pes molecular que freqüentment s'identifiquen com lipopolisacarids procedents de la paret cel·lular dels microorganismes. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, es va procedir a la quantificació d'endotoxines amb el kit comercial LAL (*Limulus Amebocyte lysate*) de la casa Pierce, que genera un senyal cromogènic en presència d'endotoxines. Aquest kit es basa en la activació del proenzim modificat del lisat de amebòcits^{ff} de *Limulus polyphemus*. Quan aquest proenzim està activat, és capaç de catalitzar el trencament d'un pèptid específic que conté p-nitroanilina, el qual un

^{ff} AMEBÒCIT: Cèl·lula pròpia de la sang i d'altres líquids orgànics dels invertebrats, generalment funcions fagocitàries.

cop alliberat té un color groc que pot ser quantificat a 405 nm. L'activació és proporcional a la concentració d'endotoxina proporcional a la mostra. Per aquest motiu, l'assaig es calibra amb una endotoxina provinent de *E. coli* el que permet expressar els resultats en forma d'unitats d'endotoxina per mL (UE mL⁻¹), a on una unitat és igual a aproximadament 0,1 ng d'endotoxina mL⁻¹ de solució.

El test va confirmar la presència d'endotoxines en la solució d'Ab230 a una concentració de $18,36 \pm 2,74$ UE mL⁻¹ (12 mg Ab230 en 6,5 mL; 596,7 UE totals). Aquest resultat indicava la necessitat de fer purificacions addicionals si volíem evitar aquest efecte negatiu dels anticossos, i volíem continuar avaluant el seu possible valor terapèutic actuant com a possibles inhibidors de l'efecte citotòxic de la 1-OHphz.

La eliminació d'endotoxines es va encarregar al Servei de Cultius Cel·lulars, producció d'Anticossos i Citometria (SCAC) de la UAB indicant que el nostre objectiu era reduir els nivells d'endotoxina a concentracions inferiors 0,1 UE mL⁻¹, que segons l'experiència del grup del Prof. Janda és la concentració per sota de la qual no afecten a les cèl·lules. Per assolir aquest objectiu, es varen utilitzar columnes comercials (*High Capacity Endotoxin Removal Spin Column*, Pierce), les quals contenen una resina amb una alta capacitat d'eliminació d'endotoxines. En concret, són partícules de cel·lulosa empaquetades que contenen poli (ϵ -lisina) amb una gran afinitat per capturar selectivament les endotoxines.

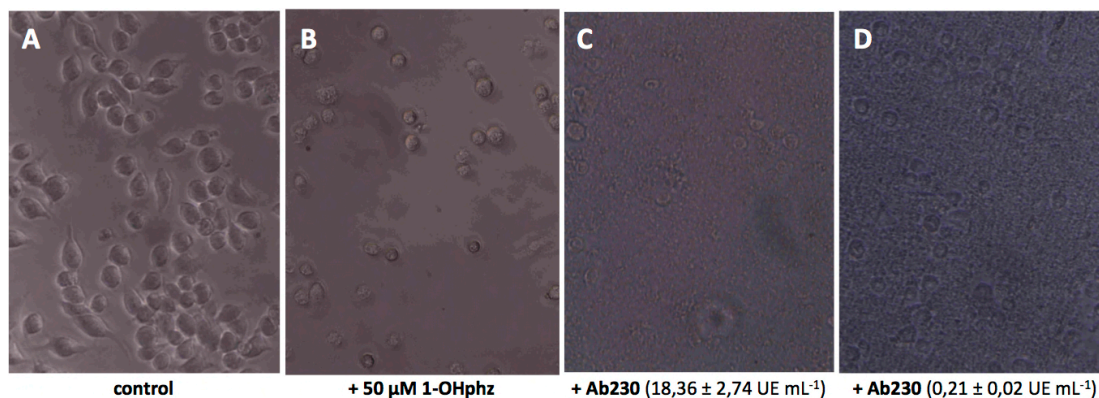


Figura 6.6 Imatges de microscòpia dels assajos amb l'Ab230 en cèl·lules RAW 264,5 en estudis de citotoxicitat en presència de 1-OHphz. Les imatges mostren cèl·lules RAW 264,5: control (A), en presència de 50 μ M de 1-OHphz (B), en presència de Ab230 amb una concentració d'endotoxines de $18,36 \pm 2,74$ UE mL⁻¹ (C) i $0,21 \pm 0,02$ UE mL⁻¹ (D).

Després de la primera purificació amb aquestes columnes es va aconseguir reduir la concentració d'endotoxines $2,43 \pm 0,43$ UE mL⁻¹ (12 mg Ab230 en 9 mL), i després d'una segona purificació es va poder obtenir una mostra d'anticòs amb una concentració d'endotoxines de $0,23 \pm 0,04$ UE mL⁻¹ (11 mg Ab230 en 9 mL). Una

tercera purificació, després de reduir el volum (1 mL) i no va aconseguir millorar el contingut d'endotoxines ($0,21 \pm 0,02$ UE mL⁻¹, 10 mg Ab230, 1 mL) i per tant vam decidir continuar endavant amb aquesta mostra d'anticòs. Es va decidir liofilitzar l'Ab230 purificat i es va tornar a avaluar el seu efecte sobre les cèl·lules, però malauradament, els efectes citotòxics seguien sent evidents a concentracions de 10 i 5 mg mL⁻¹ d'Ab230 purificat, el que significa que la concentració d'endotoxines afegides a l'assaig era de 2,1 i 1,0 UE mL⁻¹, respectivament, valors baixos però que seguien afectant de manera massa acusada la viabilitat de les cèl·lules i impedit l'avaluació terapèutica de l'Ab230 sobre les cèl·lules. La Figura 6.6 mostra una lleugera millora de viabilitat cel·lular en l'addició de l'Ab230 després de la última purificació, però es segueixen apreciant moltes cèl·lules disgregades.

En vistes dels resultats vam assumir que possiblement, donat l'origen policlonal dels anticossos potser no es podria eliminar mai aquest efecte. Generalment, per aquest tipus d'estudis es fan amb anticossos monoclonals, els quals s'obtenen per un procés molt més net i en condicions estèrils, fet que fa que la concentració d'endotoxines inicials ja sigui pràcticament inexistent i alhora fa innecessària l'etapa d'immunopurificació que també suposa un risc de contaminació. Amb aquests resultats poc esperançadors vam decidir abandonar aquesta línia d'investigació fins que en un futur poguéssim disposar d'anticossos monoclonals per reprendre els estudis en el punt on s'han deixat.

6.3 Materials i mètodes

En aquest apartat es descriuen els materials i mètodes emprats per als assajos de citotoxicitat amb línies cel·lulars descrits en el capítol 6.

Tampons i dissolucions

El tampó d'acoblament és NaHCO_3 0,2 M i NaCl 0,5 M a pH 8,3. El tampó A és etanolamina 0,5 M i NaCl 0,5 M a pH 8,3. El tampó B és acetat de sodi 0,1 M i NaCl 0,5 M a pH 4. El tampó C és citrat de sodi 0,1 M a pH 3-3,6. El tampó d'emmagatzematge és Na_2HPO_4 0,05 M i NaN_3 0,1% a pH 7. PBS és tampó fosfat 10 mM amb una solució de NaCl 140 mM a pH 7,5. Tots els tampons han estat filtrats per un filtre de 0,45 μM . El medi de cultiu és DMEM amb un 4,5% de glucosa suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS, *fetal bovine sèrum*), L-glutamina, penicil·lina/estreptomicina i aminoàcids no essencials.

Preparació suport sòlid HiTrap™ NHS-activated HP

a. Acoblament del lligand PC1-BSA

El lligand es va acoblar covalentment a la columna HiTrap™ NHS-activated HP segons les recomanacions de la casa comercial GE Healthcare. Resumidament, es va preparar una solució de PC1-BSA (1 mL, 1,45 mg mL^{-1} en tampó d'acoblament) i es va injectar a la columna a un flux de 1 mL min^{-1} . La columna es va cloure amb els taps superior i inferior i es va deixar reaccionar durant 30 min a 25°C. Posteriorment es va procedir a la desactivació de l'excés de grups actius que no havien reaccionat i al rentat dels lligands que no s'havien unit específicament a la columna. Es varen injectar alternativament tres cicles de tampó A (3 x 2 mL) i tampó B (3 x 2 mL). Finalment, la columna es va rentar amb PBS (1 x 2 mL) i es va guardar amb tampó d'emmagatzematge (2 mL).

b. Columna HiTrap™ desalting

La primera fracció de rentat després de carregar el lligand PC1-BSA es va passar per una columna HiTrap™ desalting per eliminar la NHS i poder saber la quantitat d'anígen no unit. La solució es va passar per columna HiTrap™ desalting (5 mL) seguint les recomanacions de la casa comercial GE Healthcare. Breument, la columna es va equilibrar amb PBS (25 mL), es va carregar la mostra (1,5 mL) i es va eluir amb MilliQ H_2O , recollint fraccions de 500 μL . Les fraccions es varen analitzar mitjançant el test de Bradford i les fraccions on hi havia proteïna es varen ajustar i se'n va mesurar l'absorbància a 208 nm (vegeu següent apartat c. Càlcul de l'antigen unit).

c. Càlcul de l'antigen unit

La quantitat d'antigen unit al suport es va calcular comparant la mesura d'absorbància a 280 nm de la solució de l'antigen abans de ser carregat a la columna HiTrap™ NHS-activated HP i la primera solució de rentat després de l'etapa d'acoblament, purificat per columna de HiTrap™ desalting.

- A= Carregà del lligand (Absorbància a 208 nm de la solució d'acoblament x volum injectat (mL)).

$$A = A_{280} \times \text{volum injectat}$$

- B= Quantitat no unida (Absorbància a 208 nm de la solució de rentat x volum (mL))

$$B = \frac{A_{280} \times \text{volum després de l'acoblament}}{\text{volum carregat a la desalting}}$$

El rendiment de la columna es calcula amb la següent fòrmula:

$$\% = \frac{A-B}{B} \times 100$$

d. Càlcul de la capacitat teòrica de la columna

La capacitat de la columna es calcula en funció de la quantitat de lligand PC1-BSA carregat a la columna i en funció del rendiment d'acoblament de la columna.

Purificació de l'As230 per immunoafinitat amb la columna NHS-Hp PC1-BSA

La immunopurificació de As230 per tal l'obtenir Ab230 es va fer amb la columna NHS-Hp amb l'antigen PC1-BSA covalentment immobilitzat.

- La columna d'immunoafinitat es va rentar amb PBS (5 x 1 mL). Després, es va fer una "Pre-elució" amb tampó glicina-HCl 0,1 M a pH 2,5 (2 x 1 mL). I finalment, es varen fer rentats amb PBS fins que el pH de l'eluat era el mateix que el pH de la PBS, pH 7,5.
- L'As230 purificat (NH₄)₂SO₄ al 45% (vegeu materials i mètodes del capítol 3) es va fer passar per la columna (1 mL), la sortida de la columna es va tancar, i es va incubar a temperatura ambient durant 15-30 min.
- Les IgGs no específiques es varen eliminar de la columna amb rentats de PBS (5 x 1 mL) i el contingut de proteïna dels rentats es va controlar usant l'instrument Nanodrop.
- Quan la concentració de proteïna va assolir un valor baix (0,01 mg mL⁻¹), la interacció lligant-IgG va ser interrompuda mitjançant l'elució amb glicina-HCl 0,1 M, recollint fraccions (500 µL) en tubs que contenien Tris 1 M a pH 8,8 (60 µL). El contingut de proteïna es va controlar usant el Nanodrop.

- e. Una vegada que les IgGs específiques havien eluït de la columna es va rentar amb PBS fins que l'eluent era PBS a pH 7,5.
- f. La columna es va guardar amb tampó d'emmagatzematge (3 x 1 mL).
- g. Les fraccions que contenien IgG específica es varen dialitzar contra PBS 0,5 M (2 L x 4), H₂O MQ (2 L x 1) i es varen liofilitzar.

Purificació de l'Ab230 per columnes Mabselect SuRe™

Ab230 es va purificar amb les columnes Mabselect SuRe™ segons les recomanacions de la casa comercial GE Healthcare. Resumidament, la columna es va equilibrar amb tampó PBS (1 x 10 mL), es va carregar el Ab230 (1 mL) i es va eluir l'anticòs amb el tampó C, recollint fraccions (500 µL) en tubs que contenien Tris 1 M a pH 8,8 (60 µL). El contingut de proteïna es va controlar usant el Nanodrop. Una vegada que l'Ab230 havia eluït de la columna es va rentar amb PBS fins que l'eluent era PBS a pH 7,5 i la columna es va guardar amb tampó d'emmagatzematge (3 x 1 mL).

Quantificació de la concentració d'endotoxines amb el kit comercial LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation.

La quantificació es va fer segons les recomanacions de la casa comercial Pierce. De manera breu, es va preparar una recta de calibratge (de 1 a 0,1 EU mL⁻¹ en H₂O comercial lliure d'endotoxines) a partir dels vials estocs d'endotoxina de *E. coli*. Per altra banda es va preparar una solució del reactiu de LAL afegint H₂O comercial lliure d'endotoxines (1,4 mL) al preparat liofilitzat i el substrat cromogènic (7 mg) reconstituïnt el preparat liofilitzat en H₂O lliure d'endotoxines (6,5 mL) obtenint una concentració d'aproximadament 2 mM. Un cop preparades les solucions es va procedir a la quantificació. En primer lloc, la microplaca on es realitzaria l'assaig es va escalfar amb un bloc a 37°C durant 10 min. Després, es va dispensar les solucions estoc de concentracions conegudes d'endotoxina i les mostres a quantificar (50 µL pou⁻¹ de cada una d'elles) i es va incubar la placa 5 min a 37°C. Passat el temps d'incubació, es va afegir el reactiu LAL (50 µL pou⁻¹) i es va incubar 10 min més a 37°C. Aleshores, es va afegir el substrat cromogènic (100 µL pou⁻¹) i després de 6 min es va parar la reacció afegint àcid acètic al 25% (50µL pou⁻¹). La placa es va llegir a 405 nm.

Cultius cel·lulars

Per aquest objectiu, es varen cultivar cèl·lules RAW 264,5 i A549 en flascons de cultiu T25 amb medi de cultiu. Totes les cèl·lules es van cultivar a 37°C en un ambient humidificat amb un 5% de CO₂.

Assaig de citotoxicitat de la 1-OHphz a les línies cel·lulars RAW 264,5 i A459

Es varen sembrar cèl·lules RAW 264,5 i A459 (1 mL de medi de cultiu, 5×10^5 cèl·lules pou^{-1}) en plaques de cultiu de 24 pous i es van incubar durant 2h. El medi es va retirar després de les 2h, es va afegir medi fresc (1 mL pou^{-1}) i tot seguit es va procedir a l'addició de la concentració apropiada de 1-OHphz (5 μL pou^{-1} , de solució mare en DMSO a concentracions variants de 10-0 nM), mantenint el percentatge de DMSO tan constant en cada vaset. Les cèl·lules es varen incubar durant 3 dies a 37°C en un ambient humidificat amb 5% de CO_2 i se'n va determinar la viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig MTT d'acord amb les instruccions del fabricant (Promega).

Assaig de citotoxicitat del DMSO a les línies cel·lulars RAW 264,5 i A459

L'estudi es va realitzar comparant el comportament a 1 mL, 200 μL i 100 μL de treball. Es varen sembrar cèl·lules RAW 264,5 (5×10^5 cèl·lules pou^{-1}) en volums diferents (1 mL, en plaques de 24 pous i 200 μL i 100 μL en plaques de 96 pous). Les plaques es van incubar durant 2h. El medi es va retirar després de les 2 h, es va afegir medi fresc (el mateix volum inicial, 1 mL, 200 μL o 100 μL) i tot seguit es va procedir a l'addició de diferents quantitats de DMSO (0, 0,5, 1, 2 i 5% respecte el volum total de treball). Les cèl·lules es varen incubar durant 3 dies a 37°C en un ambient humidificat amb 5% de CO_2 i se'n va determinar la viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig MTT d'acord amb les instruccions del fabricant (Promega).

Assaig d'avaluació de la capacitat inhibidora de l'Ab230 en assajos de citotoxicitat de 1-OHphz en RAW 264,5

Es varen sembrar cèl·lules RAW 264,5 (100 μL en medi de cultiu, 5×10^5 cèl·lules pou^{-1}) en microplaques de cultiu cel·lular de 96 pous i es varen incubar durant 2 h a 37°C amb atmosfera humida amb un 5% de CO_2 . Passades les 2 h, el medi es va retirar i es va addicionar l'Ab230 (100 μL pou^{-1} , 10 mg mL^{-1} (66 μM) i 5 mg mL^{-1} (33 μM) dissolt en medi de cultiu) i la 1-OHphz (1 μL pou^{-1} , 5 mM en DMSO (50 μM concentració final al pou)). Les cèl·lules RAW es van tornar a incubar durant 24 hores amb atmosfera humida i es varen anar observant per microscòpia.

Assaig Cell Titer 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT)

La quantificació de la viabilitat cel·lular es va fer segons les recomanacions de la casa comercial Promega amb els reactius provistos en el mateix kit. Pels assajos amb volums de cultiu cel·lular de 100-200 μL pou^{-1} , es va afegir la solució de tintura (15 μL pou^{-1}) i es varen incubar les cèl·lules durant 4 h a 37°C amb atmosfera humida amb un 5% de CO_2 . Després, es va parar la reacció amb afegint la solució de parada (100 μL pou^{-1}) i es va llegir afegint l'absorbància a 570 nm. Pels assajos amb volums de cultiu cel·lulars de 1 mL, el procediment va ser el mateix descrit anteriorment afegint 150 μL pou^{-1} de solució de tinció i 1 mL de solució de parada.

7 Bibliografia

-
- (1) Hauser, A. *Nature Pseudomonas Poster*, <http://www.nature.com/nrmicro/posters/pseudomonas/index.html>.
 - (2) WHO, http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/
 - (3) ECDC, *Annual epidemiological report Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data 2013*.
 - (4) Annane, D.; Bellissant, E.; Cavaillon, J.-M. *The Lancet* **2005**, *365*, 63-78.
 - (5) EPINE. Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España, 2013.
 - (6) Clatworthy, A. E.; Pierson, E.; Hung, D. T. *Nature chemical biology* **2007**, *3*, 541-548.
 - (7) Sumari tècnic de la ECDC, titulat *The bacterial Challenge:time to react*. **2009**.
 - (8) Institute, C. a. L. S.
 - (9) Mancini, N.; Carletti, S.; Ghidoli, N.; Cichero, P.; Burioni, R.; Clementi, M. *Clinical microbiology reviews* **2010**, *23*, 235-251.
 - (10) Fenollar, F.; Raoult, D. *International journal of antimicrobial agents* **2007**, *30 Suppl 1*, S7-15.
 - (11) Abubakar, I.; Irvine, L.; Aldus, C. F.; Wyatt, G. M.; Fordham, R.; Schelenz, S.; Shepstone, L.; Howe, A.; Peck, M.; Hunter, P. R. *Health technology assessment (Winchester, England)* **2007**, *11*, 1-216.
 - (12) Peters, R. P.; van Agtmael, M. A.; Danner, S. A.; Savelkoul, P. H.; Vandembroucke-Grauls, C. M. *The Lancet infectious diseases* **2004**, *4*, 751-760.
 - (13) Kubista, M.; Andrade, J. M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonak, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjogback, R.; Sjogreen, B.; Strombom, L.; Stahlberg, A.; Zoric, N. *Molecular aspects of medicine* **2006**, *27*, 95-125.
 - (14) Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **1992**, *10*, 413-417.
 - (15) Karpati, F.; Jonasson, J. *Molecular and cellular probes* **1996**, *10*, 397-403.
 - (16) Deschaght, P.; Van Daele, S.; De Baets, F.; Vanechoutte, M. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **2011**, *10*, 293-297.
 - (17) Markoulatos, P.; Siafakas, N.; Moncany, M. *Journal of clinical laboratory analysis* **2002**, *16*, 47-51.
 - (18) Chang, S. S.; Hsieh, W. H.; Liu, T. S.; Lee, S. H.; Wang, C. H.; Chou, H. C.; Yeo, Y. H.; Tseng, C. P.; Lee, C. C. *PloS one* **2013**, *8*, e62323.
 - (19) Aarthi, P.; Bagyalakshmi, R.; Therese, K. L.; Madhavan, H. N. *Microbiological research* **2013**, *168*, 497-503.
 - (20) Sheridan, G. E. C.; Masters, C. I.; Shallcross, J. A.; Mackey, B. M. *Applied and Environmental Microbiology* **1998**, *64*, 1313-1318.
 - (21) Baeumner, A. J.; Cohen, R. N.; Miksic, V.; Min, J. *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *18*, 405-413.

- (22) Lehmann, L. E.; Hunfeld, K. P.; Emrich, T.; Haberhausen, G.; Wissing, H.; Hoefft, A.; Stuber, F. *Medical microbiology and immunology* **2008**, *197*, 313-324.
- (23) Roche, http://www.roche.es/portal/roche-spain/lightcycler_septifast_test_mgrade.
- (24) Liesenfeld, O.; Lehman, L.; Hunfeld, K. P.; Kost, G. *European journal of microbiology & immunology* **2014**, *4*, 1-25.
- (25) de Lyra, J. M.; Maruza, M.; Verza, M.; Carneiro, M. M.; de Albuquerque Mde, F.; Rossetti, M. L.; Ximenes, R.; Braga, M. C.; Lucena-Silva, N. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **2014**, *109*, 805-813.
- (26) Van Lint, P.; De Witte, E.; De Henau, H.; De Muyenck, A.; Verstraeten, L.; Van Herendael, B.; Weekx, S. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **2014**.
- (27) Wu, A. H. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2006**, *369*, 119-124.
- (28) Mavrodi, D. V.; Blankenfeldt, W.; Thomashow, L. S. *Annual Review of Phytopathology* **2006**, *44*, 417-445.
- (29) aacc.org, <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2015/october/how-to-detect-and-solve-immunoassay-interference>
- (30) Yalow, R. S.; Berson, S. A. *Nature* **1959**, *184 (Suppl 21)*, 1648-1649.
- (31) Wang, N.; He, M.; Shi, H. C. *Analytica chimica acta* **2007**, *590*, 224-231.
- (32) Pandey, S. K.; Vinayaka, A. C.; Rishi, D. B.; Rishi, P.; Suri, C. R. *Analytica chimica acta* **2014**, *841*, 51-57.
- (33) Wang, C.; Wu, J.; Zong, C.; Xu, J.; Ju, H.-X. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2012**, *40*, 3-10.
- (34) Shen, Z.; Hou, N.; Jin, M.; Qiu, Z.; Wang, J.; Zhang, B.; Wang, X.; Wang, J.; Zhou, D.; Li, J. *Gut pathogens* **2014**, *6*, 14.
- (35) Georganopoulou, D. G.; Chang, L.; Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mufson, E. J.; Klein, W. L.; Mirkin, C. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 2273-2276.
- (36) Belanger, L.; Sylvestre, C.; Dufour, D. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **1973**, *48*, 15-18.
- (37) Mizutani, F.; Ohta, E.; Mie, Y.; Niwa, O.; Yasukawa, T. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, *134*, 304-308.
- (38) Armbruster, D. A.; Overcash, D. R.; Reyes, J. *The Clinical Biochemist Reviews* **2014**, *35*, 143-153.
- (39) aacc.org, HIV guideline: <https://www.aacc.org/publications/cln/cln-stat/2014/august/updated-hiv-testing-guidelines>.
- (40) Ngom, B.; Guo, Y.; Wang, X.; Bi, D. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2010**, *397*, 1113-1135.

- (41) Fabres-Klein, M. H.; Aguilar, A. P.; Silva, M. P.; Silva, D. M.; Ribon, A. O. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **2014**, *33*, 2095-2104.
- (42) Park, H. C.; Baig, I. A.; Lee, S. C.; Moon, J. Y.; Yoon, M. Y. *Applied biochemistry and biotechnology* **2014**.
- (43) Bergwerff, A. A.; van Knapen, F. *Journal of AOAC International* **2006**, *89*, 826-831.
- (44) Yang, L.; Bashir, R. *Biotechnology advances* **2008**, *26*, 135-150.
- (45) Lazcka, O.; Del Campo, F. J.; Munoz, F. X. *Biosensors & bioelectronics* **2007**, *22*, 1205-1217.
- (46) Fritz, J. *The Analyst* **2008**, *133*, 855-863.
- (47) Ohk, S.-H.; Bhunia, A. K. *Food Microbiology* **2013**, *33*, 166-171.
- (48) Wang, Y.; Ye, Z.; Si, C.; Ying, Y. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2011**, *11*, 2728-2739.
- (49) Joung, C. K.; Kim, H. N.; Lim, M. C.; Jeon, T. J.; Kim, H. Y.; Kim, Y. R. *Biosensors & bioelectronics* **2013**, *44*, 210-215.
- (50) Labib, M.; Zamay, A. S.; Kolovskaya, O. S.; Reshetneva, I. T.; Zamay, G. S.; Kibbee, R. J.; Sattar, S. A.; Zamay, T. N.; Berezovski, M. V. *Analytical chemistry* **2012**, *84*, 8966-8969.
- (51) Esteban-Fernandez de Avila, B.; Pedrero, M.; Campuzano, S.; Escamilla-Gomez, V.; Pingarron, J. M. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, *403*, 917-925.
- (52) Guo, X.; Lin, C. S.; Chen, S. H.; Ye, R.; Wu, V. C. *Biosensors & bioelectronics* **2012**, *38*, 177-183.
- (53) Park, I.-S.; Kim, W.-Y.; Kim, N. *Biosensors and Bioelectronics* **2000**, *15*, 167-172.
- (54) Nugaeva, N.; Gfeller, K. Y.; Backmann, N.; Duggelin, M.; Lang, H. P.; Guntherodt, H. J.; Hegner, M. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* **2007**, *13*, 13-17.
- (55) Dickert, F. L.; Hayden, O.; Bindeus, R.; Mann, K. J.; Blaas, D.; Waigmann, E. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2004**, *378*, 1929-1934.
- (56) Ahmed, A.; Rushworth, J. V.; Hirst, N. A.; Millner, P. A. *Clinical microbiology reviews* **2014**, *27*, 631-646.
- (57) Heo, J.; Hua, S. Z. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2009**, *9*, 4483-4502.
- (58) Carbonnelle, E.; Mesquita, C.; Bille, E.; Day, N.; Dauphin, B.; Beretti, J. L.; Ferroni, A.; Gutmann, L.; Nassif, X. *Clinical biochemistry* **2011**, *44*, 104-109.
- (59) Hoyos-Mallecot, Y.; Miranda-Casas, C.; Cabrera-Alvargonzalez, J. J.; Gomez-Camarasa, C.; Perez-Ramirez, M. D.; Navarro-Mari, J. M. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* **2013**, *31*, 152-155.
- (60) Patel, R. *Clinical Chemistry* **2015**, *61*, 100-111.

- (61) Carbonnelle, E.; Mesquita, C.; Bille, E.; Day, N.; Dauphin, B.; Beretti, J.-L.; Ferroni, A.; Gutmann, L.; Nassif, X. *Clinical biochemistry* **2011**, *44*, 104-109.
- (62) Dupré, M.; Gilquin, B.; Fenaille, F.; Feraudet-Tarisse, C.; Dano, J.; Ferro, M.; Simon, S.; Junot, C.; Brun, V.; Becher, F. *Analytical chemistry* **2015**, *87*, 8473-8480.
- (63) D'Orazio, P. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2011**, *412*, 1749-1761.
- (64) Bruno, J. G. *Pathogens* **2014**, *3*, 341-355.
- (65) Padmaja, R. J.; Akshath, U. S.; Abhijith, K. S.; Halami, P. M.; Thakur, M. S. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 5214-5220.
- (66) Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. *Science (New York, N.Y.)* **2003**, *301*, 1884-1886.
- (67) Nam, J.-M.; Stoeva, S. I.; Mirkin, C. A. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5932-5933.
- (68) Cho, M.; Chung, S.; Kim, Y. T.; Jung, J. H.; Kim, D. H.; Seo, T. S. *Lab on a Chip* **2015**, *15*, 2744-2748.
- (69) Prigodich A. E., S. D. S., Massich M. D., Giljohann D. A., Lane B. C., Mirkin C. A. *ACS Nano* **2009**, *3*, 2147-2152.
- (70) Hill, H. D.; Mirkin, C. A. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 324 - 336.
- (71) Konuku S, R. M., Muruhan S. . *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* **2012**, *2*, 70-73.
- (72) Lowy, F. D. *The New England journal of medicine* **1998**, *339*, 520-532.
- (73) Chiller, K.; Selkin, B. A.; Murakawa, G. J. *J Investig Dermatol Symp Proc* **2001**, *6*, 170-174.
- (74) Eriksen, K. R. *Ugeskrift for laeger* **1961**, *123*, 384-386.
- (75) Rodvold, K. A.; McConeghy, K. W. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2014**, *58 Suppl 1*, S20-27.
- (76) Appelbaum, P. C. *International journal of antimicrobial agents* **2007**, *30*, 398-408.
- (77) Perichon, B.; Courvalin, P. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2009**, *53*, 4580-4587.
- (78) Higgins, P. G.; Fluit, A. C.; Schmitz, F. J. *Current drug targets* **2003**, *4*, 181-190.
- (79) Drlica, K.; Zhao, X. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **1997**, *61*, 377-392.
- (80) Litzinger, S.; Mayer, C. *The Murein Sacculus*; Springer-Verlag Berlin, Heidelberger Platz 3, D-14197 Berlin, Germany, 2010, p 3-52.
- (81) Fisher, J. F.; Mobashery, S. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 4813-4829.
- (82) Zhou, X.; Cegelski, L. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8143-8153.
- (83) van Heijenoort, J. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2007**, *71*, 620-635.

- (84) Sharif, S.; Kim, S. J.; Labischinski, H.; Schaefer, J. *Biochemistry* **2009**, *48*, 3100-3108.
- (85) Berger-Bachi, B.; Tschierske, M. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **1998**, *1*, 325-335.
- (86) Vollmer, W. *FEMS microbiology reviews* **2008**, *32*, 287-306.
- (87) Thanbichler, M.; Shapiro, L. *Nature reviews. Microbiology* **2008**, *6*, 28-40.
- (88) Vijaranakul, U.; Nadakavukaren, M. J.; de Jonge, B. L.; Wilkinson, B. J.; Jayaswal, R. K. *Journal of bacteriology* **1995**, *177*, 5116-5121.
- (89) Lam, H.; Oh, D. C.; Cava, F.; Takacs, C. N.; Clardy, J.; de Pedro, M. A.; Waldor, M. K. *Science (New York, N.Y.)* **2009**, *325*, 1552-1555.
- (90) Mainardi, J. L.; Villet, R.; Bugg, T. D.; Mayer, C.; Arthur, M. *FEMS microbiology reviews* **2008**, *32*, 386-408.
- (91) Xia, G.; Kohler, T.; Peschel, A. *International journal of medical microbiology : IJMM* **2010**, *300*, 148-154.
- (92) Bertsche, U.; Yang, S. J.; Kuehner, D.; Wanner, S.; Mishra, N. N.; Roth, T.; Nega, M.; Schneider, A.; Mayer, C.; Grau, T.; Bayer, A. S.; Weidenmaier, C. *PloS one* **2013**, *8*, e67398.
- (93) Graille, M.; Stura, E. A.; Corper, A. L.; Sutton, B. J.; Taussig, M. J.; Charbonnier, J. B.; Silverman, G. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 5399-5404.
- (94) O'Connell, D. P.; Nanavaty, T.; McDevitt, D.; Gurusiddappa, S.; Höök, M.; Foster, T. J. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 6821-6829.
- (95) O'Riordan, K.; Lee, J. C. *Clinical microbiology reviews* **2004**, *17*, 218-234.
- (96) Koyama, A.; Sharmin, S.; Sakurai, H.; Shimizu, Y.; Hirayama, K.; Usui, J.; Nagata, M.; Yoh, K.; Yamagata, K.; Muro, K.; Kobayashi, M.; Ohtani, K.; Shimizu, T.; Shimizu, T. *Kidney Int* **2004**, *66*, 121-132.
- (97) Garcia-Romo, G. S.; Gonzalez-Ibarra, M.; Donis-Hernandez, F. R.; Zendejas-Buitron, V. M.; Pedroza-Gonzalez, A. *Microbiology and immunology* **2015**, *59*, 193-201.
- (98) Kuusela, P.; Hilden, P.; Savolainen, K.; Vuento, M.; Lyytikäinen, O.; Vuopio-Varkila, J. *Journal of clinical microbiology* **1994**, *32*, 143-147.
- (99) Reddy, P. K.; Shekar, A.; Kingston, J. J.; Sripathy, M. H.; Batra, H. *J Immunol Methods* **2013**, *391*, 31-38.
- (100) Poojary, N. S.; Ramlal, S.; Urs, R. M.; Sripathy, M. H.; Batra, H. V. *Microbiological research* **2014**, *169*, 924-930.
- (101) Schlievert, P. M.; Case, L. C. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2007**, *391*, 113-126.
- (102) Jin, W.; Yamada, K.; Ikami, M.; Kaji, N.; Tokeshi, M.; Atsumi, Y.; Mizutani, M.; Murai, A.; Okamoto, A.; Namikawa, T.; Baba, Y.; Ohta, M. *Journal of Microbiological Methods* **2013**, *92*, 323-331.

- (103) Jenko, K. L.; Zhang, Y.; Kostenko, Y.; Fan, Y.; Garcia-Rodriguez, C.; Lou, J.; Marks, J. D.; Varnum, S. M. *The Analyst* **2014**, *139*, 5093-5102.
- (104) Khojasteh V. J., F. H. A. *Iran J Microbiol.* **2011**, *3*, 170–176.
- (105) Fattom, A. I.; Sarwar, J.; Ortiz, A.; Naso, R. *Infection and immunity* **1996**, *64*, 1659-1665.
- (106) Wergeland, H. I.; Åsbakk, K. B.; Haaheim, L. R. *Journal of Immunological Methods* **1987**, *104*, 57-63.
- (107) Merkel, G. J.; Scofield, B. A. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **2001**, *8*, 647-651.
- (108) Wiriyaichaiorn, S.; Howarth, P. H.; Bruce, K. D.; Dailey, L. A. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **2013**, *75*, 28-36.
- (109) Ohsawa, H.; Baba, T.; Enami, J.; Hiramatsu, K. *Microbiology and immunology* **2015**, *59*, 183-192.
- (110) Amal S., K.-P. K. *Food Science and Biotechnology* **2015**, *24*, 1177-1184.
- (111) Seidl, P. H.; Schleifer, K. H. *European Journal of Biochemistry* **1977**, *74*, 353-363.
- (112) Sandhu, S.; Schouten, J. A.; Thompson, J.; Davis, M.; Bugg, T. D. *The Analyst* **2012**, *137*, 1130-1136.
- (113) Verbrugh, H. A.; Peters, R.; Rozenberg-Arska, M.; Peterson, P. K.; Verhoef, J. *The Journal of infectious diseases* **1981**, *144*, 1-9.
- (114) Wheat, L. J.; Wilkinson, B. J.; Kohler, R. B.; White, A. C. *The Journal of infectious diseases* **1983**, *147*, 16-22.
- (115) Jacobsson, G.; Colque-Navarro, P.; Gustafsson, E.; Andersson, R.; Mollby, R. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **2010**, *29*, 715-725.
- (116) Wergeland, H. I.; Haaheim, L. R.; Natas, O. B.; Wesenberg, F.; Oeding, P. *Journal of clinical microbiology* **1989**, *27*, 1286-1291.
- (117) Seidl, P. H.; Schleifer, K. H. *European journal of biochemistry / FEBS* **1977**, *74*, 353-363.
- (118) Jacob, E.; Durham, L. C.; Falk, M. C.; Williams, T. J.; Wheat, L. J. *Journal of clinical microbiology* **1987**, *25*, 122-127.
- (119) Franken, N.; Seidl, P. H.; Kuchenbauer, T.; Kolb, H. J.; Schleifer, K. H.; Weiss, L.; Tymphner, K. D. *Infection and immunity* **1984**, *44*, 182-187.
- (120) Maira-Litran, T.; Kropec, A.; Goldmann, D.; Pier, G. B. *Vaccine* **2004**, *22*, 872-879.
- (121) Chen, Y.; Liu, B.; Yang, D.; Li, X.; Wen, L.; Zhu, P.; Fu, N. *Journal of medical microbiology* **2011**, *60*, 995-1002.

- (122) Gedbjerg, N.; LaRosa, R.; Hunter, J. G.; Varrone, J. J.; Kates, S. L.; Schwarz, E. M.; Daiss, J. L. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **2013**, *95*, e171.
- (123) Croze, M.; Dauwalder, O.; Dumitrescu, O.; Badiou, C.; Gillet, Y.; Genestier, A. L.; Vandenesch, F.; Etienne, J.; Lina, G. *Clinical Microbiology and Infection* **2009**, *15*, 144-148.
- (124) Nishitani, K.; Beck, C. A.; Rosenberg, A. F.; Kates, S. L.; Schwarz, E. M.; Daiss, J. L. *Clinical orthopaedics and related research* **2015**, *473*, 2735-2749.
- (125) Stentzel, S.; Sundaramoorthy, N.; Michalik, S.; Nordengrün, M.; Schulz, S.; Kolata, J.; Kloppot, P.; Engelmann, S.; Steil, L.; Hecker, M.; Schmidt, F.; Völker, U.; Roghmann, M.-C.; Bröker, B. M. *Journal of Proteomics* **2015**, *128*, 1-7.
- (126) Verkaik, N. J.; Dauwalder, O.; Antri, K.; Boubekri, I.; de Vogel, C. P.; Badiou, C.; Bes, M.; Vandenesch, F.; Tazir, M.; Hooijkaas, H.; Verbrugh, H. A.; van Belkum, A.; Etienne, J.; Lina, G.; Ramdani-Bougoussa, N.; van Wamel, W. J. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2010**, *50*, 61-68.
- (127) Weist, K.; Cimbali, A. K.; Lecke, C.; Kampf, G.; Ruden, H.; Vonberg, R. P. *Journal of medical microbiology* **2006**, *55*, 283-290.
- (128) Huang, S.-H.; Wei, H.-C.; Lee, Y.-C. *Food Control* **2007**, *18*, 893-897.
- (129) Badiou, C.; Dumitrescu, O.; George, N.; Forbes, A. R.; Drougka, E.; Chan, K. S.; Ramdani-Bougoussa, N.; Meugnier, H.; Bes, M.; Vandenesch, F.; Etienne, J.; Hsu, L. Y.; Tazir, M.; Spiliopoulou, I.; Nimmo, G. R.; Hulten, K. G.; Lina, G. *Journal of clinical microbiology* **2010**, *48*, 1384-1390.
- (130) Su, F.-y.; Endo, Y.; Saiki, H.; Xing, X.-H.; Ohmura, N. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *22*, 2500-2507.
- (131) Rubina, A. Y.; Filippova, M. A.; Feizkhanova, G. U.; Shepeliakovskaya, A. O.; Sidina, E. I.; Boziev, K. M.; Laman, A. G.; Brovko, F. A.; Vertiev, Y. V.; Zasedatelev, A. S.; Grishin, E. V. *Analytical chemistry* **2010**, *82*, 8881-8889.
- (132) Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2008**, *391*, 837-845.
- (133) Esteban-Fernández de Ávila, B.; Pedrero, M.; Campuzano, S.; Escamilla-Gómez, V.; Pingarrón, J. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, *403*, 917-925.
- (134) Sharif, S.; Singh, M.; Kim, S. J.; Schaefer, J. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 7023-7030.
- (135) Sharif, S.; Singh, M.; Kim, S. J.; Schaefer, J. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 7023-7030.
- (136) Barton, L. L. *The Cellular System*, 2005.
- (137) Hirschfield, G. R.; McNeil, M.; Brennan, P. J. *Journal of bacteriology* **1990**, *172*, 1005-1013.
- (138) Dhawan, M. D.; Wise, F.; Baeumner, A. J. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2002**, *374*, 421-426.

- (139) Mocan, L.; Ilie, I.; Matea, C.; Tabaran, F.; Kalman, E.; Iancu, C.; Mocan, T. *International journal of nanomedicine* **2014**, *9*, 1453-1461.
- (140) Edge, A. S. B. *Biochem. J.* **2003**, *376*, 339-350.
- (141) Edge, A. S. B.; Faltynek, C. R.; Hof, L.; Reichert, L. E.; Weber, P. *Analytical Biochemistry* **1981**, *118*, 131-137.
- (142) Aldrich, Chemical Deglycosylation Strategies. https://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15880/chemical_and_enzymatic_deglycosylation_strategies.pdf
- (143) Glycofree™ chemical deglycosylation kit.
- (144) Sojar, H. T.; Bahl, O. P. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1987**, *259*, 52-57.
- (145) Karyakin, A. A.; Presnova, G. V.; Rubtsova, M. Y.; Egorov, A. M. *Analytical chemistry* **2000**, *72*, 3805-3811.
- (146) Manson, M. M. *Immunochemical Protocols*: Humana Press: Totowa, New Jersey, 1992; Vol. Vol. 10.
- (147) Scientific, T. Calculate dye:protein (F/P) molar ratios (TECH TIP #31). <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/TR0031-Calc-FP-ratios.pdf>
- (148) Iglewski, B. H. *Pseudomonas.*; Univ of Texas Medical Branch, 1996.
- (149) Palleroni, N. J. *Environmental microbiology* **2010**, *12*, 1377-1383.
- (150) Todar, K. *Online textbook of Bacteriology*, <https://www.textbookofbacteriology.net/>
- (151) Matias, V. R.; Al-Amoudi, A.; Dubochet, J.; Beveridge, T. J. *Journal of bacteriology* **2003**, *185*, 6112-6118.
- (152) Spoering, A. L.; Lewis, K. *Journal of bacteriology* **2001**, *183*, 6746-6751.
- (153) Fernandez, L.; Hancock, R. E. *Clinical microbiology reviews* **2012**, *25*, 661-681.
- (154) Lister, P. D.; Wolter, D. J.; Hanson, N. D. *Clinical microbiology reviews* **2009**, *22*, 582-610.
- (155) Papaioannou, E.; Utari, P. D.; Quax, W. J. *International journal of molecular sciences* **2013**, *14*, 19309-19340.
- (156) Dietrich, L. E.; Price-Whelan, A.; Petersen, A.; Whiteley, M.; Newman, D. K. *Mol Microbiol* **2006**, *61*, 1308-1321.
- (157) Dandekar, A. A.; Greenberg, E. P. *Nature chemical biology* **2013**, *9*, 292-293.
- (158) Pierson, L. S., 3rd; Pierson, E. A. *Applied microbiology and biotechnology* **2010**, *86*, 1659-1670.
- (159) Kitahara, T.; Kinoshita, Y.; Aono, S.; Miyake, M.; Hasegawa, T.; Watanabe, H.; Mori, K. *Pure & Appl. Chem* **1994**, *66*, 2083-2086.
- (160) Rada, B.; Leto, T. L. *Trends in microbiology* **2013**, *21*, 73-81.

- (161) Hui J., W. W., Hu H., Peng H., Zhang X. *Journal of Applied Biotechnology* **2014**, 2.
- (162) Usher, L. R.; Lawson, R. A.; Geary, I.; Taylor, C. J.; Bingle, C. D.; Taylor, G. W.; Whyte, M. K. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2002**, 168, 1861-1868.
- (163) McFarland, A. J.; Anoopkumar-Dukie, S.; Perkins, A. V.; Davey, A. K.; Grant, G. D. *Archives of toxicology* **2012**, 86, 275-284.
- (164) Muller, M. *Free Radical Biology and Medicine* **2006**, 41, 1670-1677.
- (165) Stewart-Tull, D. E.; Armstrong, A. V. *Journal of medical microbiology* **1972**, 5, 67-73.
- (166) Cezairliyan, B.; Vinayavekhin, N.; Grenfell-Lee, D.; Yuen, G. J.; Saghatelian, A.; Ausubel, F. M. *PLoS Pathog* **2013**, 9, e1003101.
- (167) Bellin, D. L.; Sakhtah, H.; Rosenstein, J. K.; Levine, P. M.; Thimot, J.; Emmett, K.; Dietrich, L. E. P.; Shepard, K. L.
- (168) Mavrodi, D. V.; Bonsall, R. F.; Delaney, S. M.; Soule, M. J.; Phillips, G.; Thomashow, L. S. *Journal of bacteriology* **2001**, 183, 6454-6465.
- (169) Silva, L. V.; Galdino, A. C.; Nunes, A. P.; Dos Santos, K. R.; Moreira, B. M.; Cacci, L. C.; Sodre, C. L.; Ziccardi, M.; Branquinha, M. H.; Santos, A. L. *International journal of medical microbiology* **2014**, 304, 990-1000.
- (170) Hunter, R. C.; Klepac-Ceraj, V.; Lorenzi, M. M.; Grotzinger, H.; Martin, T. R.; Newman, D. K. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **2012**, 47, 738-745.
- (171) Webster, T. A.; Sismaet, H. J.; Conte, J. L.; Chan, I. P.; Goluch, E. D. *Biosensors & bioelectronics* **2014**, 60, 265-270.
- (172) Wilson, R.; Sykes, D. A.; Watson, D.; Rutman, A.; Taylor, G. W.; Cole, P. J. *Infection and immunity* **1988**, 56, 2515-2517.
- (173) Caldwell, C. C.; Chen, Y.; Goetzmann, H. S.; Hao, Y.; Borchers, M. T.; Hassett, D. J.; Young, L. R.; Mavrodi, D.; Thomashow, L.; Lau, G. W. *The American journal of pathology* **2009**, 175, 2473-2488.
- (174) Fothergill, J. L.; Mowat, E.; Ledson, M. J.; Walshaw, M. J.; Winstanley, C. *Journal of medical microbiology* **2010**, 59, 472-481.
- (175) Mowat, E.; Paterson, S.; Fothergill, J. L.; Wright, E. A.; Ledson, M. J.; Walshaw, M. J.; Brockhurst, M. A.; Winstanley, C. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2011**, 183, 1674-1679.
- (176) Reimer, A.; Edvaller, B.; Johansson, B. *Acta oto-laryngologica. Supplementum* **2000**, 543, 86-88.
- (177) Winstanley, C.; Fothergill, J. L. *FEMS microbiology letters* **2009**, 290, 1-9.
- (178) Fothergill, J. L.; Panagea, S.; Hart, C. A.; Walshaw, M. J.; Pitt, T. L.; Winstanley, C. *BMC microbiology* **2007**, 7, 45.
- (179) Aaron, S. D.; Vandemheen, K. L.; Ramotar, K.; Giesbrecht-Lewis, T.; Tullis, E.; Freitag, A.; Paterson, N.; Jackson, M.; Loughheed, M. D.; Dowson, C.; Kumar, V.;

Ferris, W.; Chan, F.; Doucette, S.; Fergusson, D. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **2010**, *304*, 2145-2153.

(180) Panagea, S.; Winstanley, C.; Parsons, Y. N.; Walshaw, M. J.; Ledson, M. J.; Hart, C. A. *Molecular diagnosis : a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology* **2003**, *7*, 195-200.

(181) Scott, F. W.; Pitt, T. L. *Journal of medical microbiology* **2004**, *53*, 609-615.

(182) Jeukens, J.; Boyle, B.; Kukavica-Ibrulj, I.; Ouellet, M. M.; Aaron, S. D.; Charette, S. J.; Fothergill, J. L.; Tucker, N. P.; Winstanley, C.; Levesque, R. C. *PloS one* **2014**, *9*, e87611.

(183) De Vos, D.; De Chial, M.; Cochez, C.; Jansen, S.; Tummler, B.; Meyer, J. M.; Cornelis, P. *Archives of microbiology* **2001**, *175*, 384-388.

(184) Jayaseelan, S.; Ramaswamy, D.; Dharmaraj, S. *World journal of microbiology & biotechnology* **2014**, *30*, 1159-1168.

(185) Meyer, J. M. *Archives of microbiology* **2000**, *174*, 135-142.

(186) Cornelis, P.; Dingemans, J. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2013**, *3*, 75.

(187) Meyer, J. M.; Gruffaz, C.; Raharinosy, V.; Bezverbnaya, I.; Schafer, M.; Budzikiewicz, H. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **2008**, *21*, 259-271.

(188) Visca, P.; Imperi, F.; Lamont, I. L. *Trends in microbiology* **2007**, *15*, 22-30.

(189) Banin, E.; Vasil, M. L.; Greenberg, E. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 11076-11081.

(190) Patriquin, G. M.; Banin, E.; Gilmour, C.; Tuchman, R.; Greenberg, E. P.; Poole, K. *Journal of bacteriology* **2008**, *190*, 662-671.

(191) Jimenez, P. N.; Koch, G.; Thompson, J. A.; Xavier, K. B.; Cool, R. H.; Quax, W. J. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2012**, *76*, 46-65.

(192) Cobessi, D.; Celia, H.; Pattus, F. *Journal of molecular biology* **2005**, *352*, 893-904.

(193) Cohen, T. S.; Prince, A. *Nature medicine* **2012**, *18*, 509-519.

(194) Doring, G.; Flume, P.; Heijerman, H.; Elborn, J. S. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **2012**, *11*, 461-479.

(195) Conway, S.; Balfour-Lynn, I. M.; De Rijcke, K.; Drevinek, P.; Foweraker, J.; Havermans, T.; Heijerman, H.; Lannefors, L.; Lindblad, A.; Macek, M.; Madge, S.; Moran, M.; Morrison, L.; Morton, A.; Noordhoek, J.; Sands, D.; Vertommen, A.; Peckham, D. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **2014**, *13s1*, S3-s22.

(196) Colombo, C.; Littlewood, J. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **2011**, *10 Suppl 2*, S7-15.

- (197) Hauser, A. R.; Jain, M.; Bar-Meir, M.; McColley, S. A. *Clinical microbiology reviews* **2011**, *24*, 29-70.
- (198) Stanislavsky, E. S.; Lam, J. S. *FEMS microbiology reviews* **1997**, *21*, 243-277.
- (199) Mauch, R. M.; Levy, C. E. *Journal of Cystic Fibrosis* **2014**, *13*, 499-507.
- (200) Pollack, M.; Prescott, R. K. *The Journal of infectious diseases* **1982**, *145*, 688-698.
- (201) Galloway, D. R.; Hedstrom, R. C.; Pavlovskis, O. R. *Infection and immunity* **1984**, *44*, 262-267.
- (202) Aanaes, K.; Johansen, H. K.; Poulsen, S. S.; Pressler, T.; Buchwald, C.; Høiby, N. *Journal of Cystic Fibrosis* **2013**, *12*, 81-87.
- (203) Pier, G. B.; Boyer, D.; Preston, M.; Coleman, F. T.; Llosa, N.; Mueschenborn-Koglin, S.; Theilacker, C.; Goldenberg, H.; Uchin, J.; Priebe, G. P.; Grout, M.; Posner, M.; Cavacini, L. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2004**, *173*, 5671-5678.
- (204) Pier, G. B. *Carbohydrate research* **2003**, *338*, 2549-2556.
- (205) de Kievit, T. R.; Lam, J. S. *Journal of bacteriology* **1994**, *176*, 7129-7139.
- (206) Amara, N.; Krom, B. P.; Kaufmann, G. F.; Meijler, M. M. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 195-208.
- (207) Kaufmann, G. F.; Park, J.; Mee, J. M.; Ulevitch, R. J.; Janda, K. D. *Molecular immunology* **2008**, *45*, 2710-2714.
- (208) Palliyil, S.; Downham, C.; Broadbent, I.; Charlton, K.; Porter, A. J. *Appl Environ Microbiol* **2014**, *80*, 462-469.
- (209) Erickson, D. L.; Endersby, R.; Kirkham, A.; Stuber, K.; Vollman, D. D.; Rabin, H. R.; Mitchell, I.; Storey, D. G. *Infect Immun.* **2002**, *70*, 1783-1790.
- (210) Daines, C.; VanDeVanter, D.; Khan, U.; Emerson, J.; Heltshe, S.; McNamara, S.; Anstead, M.; Langkamp, M.; Doring, G.; Ratjen, F.; Ramsey, B.; Gibson, R. L.; Morgan, W.; Rosenfeld, M. *Journal of Cystic Fibrosis* **2014**, *13*, 542-549.
- (211) Shigematsu, T.; Suda, N.; Okuda, K.; Fukushima, J. *Microbiology and immunology* **2007**, *51*, 1149-1159.
- (212) Bekir, K.; Bousimma, F.; Barhoumi, H.; Fedhila, K.; Maaref, A.; Bakhrouf, A.; Ouada, H. B.; Namour, P.; Jaffrezic-Renault, N.; Mansour, H. B. *Environmental science and pollution research international* **2015**.
- (213) Watson, D.; MacDermot, J.; Wilson, R.; Cole, P. J.; Taylor, G. W. *European journal of biochemistry / FEBS* **1986**, *159*, 309-313.
- (214) Hassett, D. J.; Charniga, L.; Bean, K.; Ohman, D. E.; Cohen, M. S. *Infection and immunity* **1992**, *60*, 328-336.
- (215) Vukomanovic, D. V.; Zoutman, D. E.; Marks, G. S.; Brien, J. F.; van Loon, G. W.; Nakatsu, K. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **1996**, *36*, 97-102.

- (216) Sharp, D.; Gladstone, P.; Smith, R. B.; Forsythe, S.; Davis, J. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* **2010**, *77*, 114-119.
- (217) Chen, W.; Liu, X. Y.; Qian, C.; Song, X. N.; Li, W. W.; Yu, H. Q. *Biosensors & bioelectronics* **2014**, *64c*, 25-29.
- (218) Wu, X.; Chen, J.; Li, X.; Zhao, Y.; Zughailer, S. M. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2014**.
- (219) Surrey, A. R. *Organic syntheses; an annual publication of satisfactory methods for the preparation of organic chemicals* **1946**, *26*, 86-90.
- (220) Carlson, B. W.; Miller, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 479-485.
- (221) Chen, N.; Jain, N.; Xu, J.; Reuman, M.; Li, X.; Russell, R. K.; Sui, Z. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 5909-5913.
- (222) Vivian, D. L. *Nature* **1956**, *178*, 753-753.
- (223) Jayaram, L.; Parameswaran, K.; Sears, M. R.; Hargreave, F. E. *The European respiratory journal* **2000**, *16*, 150-158.
- (224) Hargreave, F. E. *Canadian respiratory journal : journal of the Canadian Thoracic Society* **1999**, *6*, 169-174.
- (225) Cox, C. D. *Infection and immunity* **1986**, *52*, 263-270.
- (226) European Center for Control and Disease Prevention, h. w. e. e. e.
- (227) Williams, B. J.; Dehnbostel, J.; Blackwell, T. S. *Respirology (Carlton, Vic.)* **2010**, *15*, 1037-1056.
- (228) Anuj, S. N.; Whiley, D. M.; Kidd, T. J.; Bell, S. C.; Wainwright, C. E.; Nissen, M. D.; Sloots, T. P. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *63*, 127-131.
- (229) Pang, W.; Zhao, H.; Kim, E. S.; Zhang, H.; Yu, H.; Hu, X. *Lab Chip* **2012**, *12*, 29-44.
- (230) Prodromidis, M. I. *Electrochim Acta.* **2010**, *55*, 4227-4233.
- (231) Bojorge Ramirez, N.; Salgado, A. M.; Valdman, B. *Braz. J. Chem. Eng.* **2009**, *26*, 227-249.
- (232) Mohammed, M.-I.; Desmulliez, M. P. Y. *Lab Chip* **2011**, *11*, 569-595.
- (233) Fernandez, F.; Sanchez-Baeza, F.; Pilar Marco, M. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *34*, 151-158.
- (234) Valiokas, R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 347-356.
- (235) Sotiriou, G. A. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* **2012**, *5*, 19-30.
- (236) Schulz, A.; McDonagh, C. *Soft Matter* **2012**, *8*, 2579-2585.
- (237) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. *Chem Rev.* **2012**, *112*, 2739-2779.
- (238) Jain, K. K. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 2002-2009.

- (239) Lee, S. H.; Sung, J. H.; Park, T. H. *Ann Biomed Eng* **2012**, *40*, 1384-1397.
- (240) Sanvicens, N.; Pastells, C.; Pascual, N.; Marco, M. P. *Trends Analyt Chem.* **2009**, *28*, 1243-1252.
- (241) Lau, G. W.; Hassett, D. J.; Ran, H.; Kong, F. *Trends Mol Med.* **2004**, *10*, 599-606.
- (242) Mowat, E.; Paterson, S.; Fothergill, J. L.; Wright, E. A.; Ledson, M. J.; Walshaw, M. J.; Brockhurst, M. A.; Winstanley, C. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *183*, 1674-1679.
- (243) Caldwell, C. C.; Chen, Y.; Goetzmann, H. S.; Hao, Y.; Borchers, M. T.; Hassett, D. J.; Young, L. R.; Mavrodi, D.; Thomashow, L.; Lau, G. W. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 2473-2488.
- (244) Fothergill, J.; Panagea, S.; Hart, C.; Walshaw, M.; Pitt, T.; Winstanley, C. *BMC Microbiology* **2007**, *7*, 45.
- (245) Cabeen, M. T. *PloS one* **2014**, *9*, e88743.
- (246) Hunter, R. C.; Klepac-Ceraj, V.; Lorenzi, M. M.; Grotzinger, H.; Martin, T. R.; Newman, D. K. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2012**, *47*, 738-745.
- (247) Webster, T. A.; Sismaet, H. J.; Conte, J. L.; Chan, I. P.; Goluch, E. D. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *60*, 265-270.
- (248) Wilson, R.; Sykes, D. A.; Watson, D.; Rutman, A.; Taylor, G. W.; Cole, P. J. *Infection and Immunity* **1988**, *56*, 2515-2517.
- (249) Kurachi, M. *Bull. Inst. Chem Res.* **1958**, *36*, 174-187.
- (250) Essar, D. W.; Eberly, L.; Hadero, A.; Crawford, I. P. *J. Bacteriol.* **1991**, *172*, 884-900.
- (251) Malley, Y. Q.; Reszka, K. J.; Spitz, D. R.; Denning, G. M.; Britigan, B. E. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2004**, *287*, L94-L103.
- (252) El-Mowafy, S. A.; Abd El Galil, K. H.; El-Messery, S. M.; Shaaban, M. I. *Microb Pathog.* **2014**, *74*, 25-32.
- (253) Watson, D.; MacDermot, J.; Wilson, R.; Cole, P. J.; Taylor, G. W. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *159*, 309-313.
- (254) Reimer, Å. *Acta Otolaryngol* **2000**, *120*, 86-88.
- (255) Sharp, D.; Gladstone, P.; Smith, R. B.; Forsythe, S.; Davis, J. *Bioelectrochemistry* **2010**, *77*, 114-119.
- (256) Chen, W.; Liu, X. Y.; Qian, C.; Song, X. N.; Li, W. W.; Yu, H. Q. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *64c*, 25-29.
- (257) Wu, X.; Chen, J.; Li, X.; Zhao, Y.; Zughaier, S. M. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2014**.
- (258) Vivian, D. L. *Nature.* **1956**, *178*, 753.
- (259) Surrey, R. A. *Organic Syntheses Collective* **1955**, *3*, 753-756.

- (260) Ballesteros, B.; Barceló, D.; Camps, F.; Marco, M.-P. *Anal. Chim. Acta.* **1997**, *347*, 139-147.
- (261) Carlson, B.; Miller, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 479-485.
- (262) Kitahara, T.; Kinoshita, Y.; Aono, S.; Miyake, M.; Hasegawa, T.; Watanabe, H.; Mori, K. *Pure & Appl. Chem.* **1994**, *66*, 2083-2086.
- (263) Ansell, M. F.; Gosden, A. F.; Leslie, V. J.; Murray, R. A. *J. Chem. Soc. C.* **1971**, 1401-1414.
- (264) Mateo Alonso, A.; Horcajada, R.; Groombridge, H. J.; Chudasama, R.; Motevalli, M.; Utley, J. H. P.; Wyatt, P. B. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2832-2841.
- (265) Manson, M. M. *Humana Press: Totowa, New Jersey* **1992**, Vol. 10.
- (266) Kaufmann, G.; Park, J.; Mayorov, A.; Kubitz, D.; Janda, K. In *Quorum Sensing*, Rumbaugh, K. P., Ed.; Humana Press, 2011, pp 299-311.
- (267) Stockert, J. C.; Blázquez-Castro, A.; Cañete, M.; Horobin, R. W.; Villanueva, Á. *Acta Histochemica* **2012**, *114*, 785-796.
- (268) Kaufmann, G. F.; Sartorio, R.; Lee, S.-H.; Mee, J. M.; Altobelli, L. J.; Kujawa, D. P.; Jeffries, E.; Clapham, B.; Meijler, M. M.; Janda, K. D. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2802-2803.
- (269) Kaufmann, G. F.; Park, J.; Mayorov, A. V.; Kubitz, D. M.; Janda, K. D. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, *692*, 299-311.

8 Índex de taules i figures

8.1 TAULES

Taula 1.1 Panell de patògens detectats pel SeptiFast®. †Compresos <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. warneri</i> . ‡Compresos <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. cristatus</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. milleri</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. parasanguinis</i>	22
Taula 1.2 Recull sensors per a la detecció de patògens.....	26
Taula 3.1 Anticossos contra <i>S. aureus</i> i la seva utilitat	64
Taula 3.2 Densitat de fluoròfor del conjugats Ab291-TRITC.....	81
Taula 3.3 Paràmetres dels immunoassajos emprant PG, PSau7 i <i>S. aureus</i> en tampó com a estàndards en format de micromatriu. Les corbes de PG i PSau7 estan preparades en PBT i les de <i>S. aureus</i> en PBST.....	82
Taula 3.4. Paràmetres dels immunoassajos per a la detecció de <i>S. aureus</i> en tampó PBST i matriu provinents del tractament de deglicosilació (PBST-D) amb PSau7 i PG com a estàndards.	117
Taula 4.1 Tècniques per a la detecció de piocianina.....	140
Taula 4.2 Condicions dels diversos experiments que es van assajar per a la N-alquilació de 1-OHphz.....	147
Taula 4.3 Concentracions de 1-OHphz i PYO mesurades al llarg del creixement bacterià de les soques DKN263 i DKN330 en medi MH.	152
Taula 4.4 Concentracions de 1-OHphz i PYO mesurades al llarg del creixement bacterià d'una soca provinent d'hemocultiu positiu en medi MH.	153
Taula 4.5. Paràmetres de l'immunoassaig per a la detecció de 1-OHphz i PYO en tampó, esput i en medi MH.	193

8.2 FIGURES

Figura 1.1 Evolució temporal de l'ús de nous antibiòtics i la resistència antimicrobiana observada. El cronograma mostra en la part superior l'any en què cadascun dels antibiòtics es va desenvolupar i en la part inferior la data en què es va observar per primer cop la residència antimicrobiana de cadascun dels antibiòtics. Figura adaptada ⁶	17
---	----

Figura 1.2 Diances tradicionals dels antibiòtics: inhibidors de la síntesi DNA o RNA (ex. fluoroquinolones), inhibició de la síntesi de proteïnes (ex. aminoglicòsids), inhibició de la síntesi de la paret bacteriana (ex. lactames), inhibició de la síntesi de l'àcid fòlic (ex. sulfonamides) o despolarització del potencial de la membrana bacteriana (ex. daptomicina). Reproduït i adaptat ⁶	18
Figura 1.3 Esquema de les diferències entre A. PCR i B. PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR).	21
Figura 1.4 Esquema típic d'un biosensor amb les seves tres parts associades: a) Plataforma sensora biofuncionantitzada per al reconeixement específic. b) Plataforma de transducció que genera un senyal mesurable c) Amplificador i processador de la senyal per donar una estimació de la quantificació de l'anàlit capturat	25
Figura 1.5 a) Estructura d'un nanotub de carboni. b) Imatge d'un microscopi de transmissió d'electrons (TEM, <i>Transmission Electron Microscopy</i>) de nanopartícules de plata. La barra de l'escala és de 50 nm en ambdues fotografies. c) Imatge d'un microscopi electrònic d'escombratge (SEM, <i>Scanning Electron Microscopy</i>) de nanofils de ZnO. d) Fotoluminescència dels quantum dots aliats de CdSxSe1-x/ZnS de 6 nm de diàmetre.....	28
Figura 1.6 Representació de l'assaig <i>biobarcodes</i> a) per a la detecció de proteïnes o b) per a la detecció de DNA. c) representació escanomètrica del mètode de detecció. Au-NP, nanopartícules d'or; MMP, micropartícules magnètiques. Reproduït de l'article ⁷⁰	30
Figura 2.1 Esquema de l'estructura de la tesi, divisió dels capítols i publicacions derivades.....	48
Figura 3.1 Classificació científica de l'espècie <i>S. aureus</i> i imatges de l'espècie. a) Imatge SEM d'una colònia de <i>S. aureus</i> . b) Placa de Manitol-sal-agar amb colònies de <i>Micrococcus</i> sp. (1), <i>Staphylococcus epidermis</i> (2) i <i>S. aureus</i> . (3). Reproduït amb permís de l'article ⁷¹	55
Figura 3.2 Percentatge de soques MRSA invasores aïllades en sang i fluid cerebrospinal a la Unió Europea el 2011. Reproduït amb permís de EARS-Net ³	58
Figura 3.3 Esquema de l'estructura química del peptidoglicà de <i>S. aureus</i> . a) Esquema de la distribució i hidrolases que trenquen enllaços del PG. b) Representació tridimensional dels enllaços peptídics c) <i>o</i> -acetilació del MurNAc. Reproduït amb permís dels articles ^{82,87}	60
Figura 3.4 Estructures de les càpsules de <i>S. aureus</i> de tipus 5 i tipus 8.....	61

Figura 3.5 Immunogen emprat per Sandhu i col·laboradors ¹¹² per al desenvolupament d'anticossos contra la paret bacteriana de <i>S. aureus</i>	64
Figura 3.6 Fotos del diferents aparells per lisar bactèries mitjançant mètodes físics. a) Sonda d'ultrasons b) Premsa francesa c) Homogeneïtzador de boles i d) Làser acoblat a microscopi confocal de l'institut de fotònica (fotografia realitzada a l'Institut de Ciències Fotòniques, ICFO).	72
Figura 3.7 A. Corbes de calibratge generades amb el PSau7 i el PSau7 tractat B. Corbes de calibratge del PG i el PG tractat amb làser.....	73
Figura 3.8 Imatges obtingudes dels diferents bacteris en un microscopi confocal E1000 i CytoViva®. Per a <i>S. aureus</i> s'han fet dúpliques (disposades horitzontalment sobre el portaobjectes) de bacteris sense tractar (a), tractats amb làser (b) i ultrasons (c).....	75
Figura 3.9 Esquema de la funcionalització del vidre amb GPTMS	77
Figura 3.10 Resultats obtinguts en els experiments no competitius de tipus 2D en format de micromatriu.	78
Figura 3.11 Resultats obtinguts pel que fa a la determinació de PG amb l'assaig As291/PSau3-BSA en format de micromatriu emprant solucions de PG de <i>S. aureus</i> com a estàndard. La grandària dels punts és d'aproximadament 100 micròmetres.....	78
Figura 3.12 Resultats obtinguts pel que fa a la determinació de PSau7 en l'assaig As291/PSau3-BSA en format de micromatriu emprant solucions de PSau7 sintètic com a estàndard. La grandària dels punts és d'aproximadament 100 micròmetres.....	79
Figura 3.13 Resultats obtinguts pel que fa a la determinació de <i>S. aureus</i> en l'assaig As291/PSau3-BSA en format de micromatriu emprant solucions de <i>S. aureus</i> procedents de medi de cultiu i diluïdes amb tampó com a estàndard. La grandària dels punts és d'aproximadament 100 micròmetres.....	79
Figura 3.14 Esquema de la reacció de conjugació d'un anticòs a TRITC. L'anticòs te 30-35 de residus de lisina accessibles.....	81
Figura 3.15 Resultats obtinguts en l'assaig As291/ <i>S. aureus</i> /Ab291-TRITC de tipus micromatriu en format sandvitx emprant solucions de <i>S. aureus</i> com a estàndard. La grandària dels punts és d'aproximadament 100 micròmetres. ..	82
Figura 3.16 A. Esquema de l'assaig ELISA en format indirecte competitiu i estructura de l'epítot del peptidoglicà que reconeixen els anticossos obtinguts. B. Corba de calibratge del PG en tampó (PBT) C. Corba de calibratge del PSau5 i/o PSau7 en tampó PBT, en extracte de deglicosilació (PBST-D), BAL deglicosilat (BAL delgic.) i BAS deglicosilat (BAS delgic.).....	115

Figura 4.1 Classificació científica de l'espècie <i>P. aeruginosa</i> i imatges de l'espècie. a) Imatge de microscopi d'escombratge d'electrons. b) Colònies de <i>P. aeruginosa</i> en placa d'agar de color verd característic. Imatges reproduïdes amb permís de ¹⁵⁰	127
Figura 4.3 Model de molècules que participen en el QS de <i>P. aeruginosa</i> . Figura adaptada ¹⁵⁷	131
Figura 4.4 Biosíntesi de fenazines en la <i>P. aeruginosa</i> . Els gens que codifiquen les proteïnes involucrades en el procés de producció estan escrits sobre les fletxes ¹⁶⁸	132
Figura 4.5 Estructures dels tres tipus de pioverdines (PVD) en <i>P. aeruginosa</i> : PVD grup I, PVD grup II i PVD grup III. aThr, alo-teronina; cDab, anell de tetrahidropirimidina generat per la condensació de Dab amb el grup amino precedent; Chr, crom. Imatges reproduïdes amb permís de ¹⁹¹	134
Figura 4.6 Prevalences de diversos patògens respiratoris comuns en la CF en funció de l'edat ¹⁹⁷	136
Figura 4.7 Estructura química dels tres haptens de PYO proposats per a la preparació d'immunoreactius. Les fletxes indiquen la posició en què s'introdueix la modificació de l'estructura química de l'anàlit.....	143
Figura 4.8 Anàlisi retrosintètica per a la preparació dels haptens A i B i síntesi de la PYO.....	144
Figura 4.9 Condensació de la <i>o</i> -quinona (2) amb el diaminobenzè (3) per obtenir la metoxifenazina (4).....	145
Figura 4.10 Obtenció del 1-hidroxifenazina (5) a partir de la 1-metoxifenazina (4).....	145
Figura 4.11 Esquema alternatiu per a la síntesi de 1-OHphz (5) a partir de la fenazina (10).....	146
Figura 4.12 Síntesi de la PYO.....	146
Figura 4.13 Efecte matriu del medi de cultiu <i>Müller Hinton</i> . A. La figura mostra les diferents corbes de calibratge preparades a partir de dilucions del medi MH en PBST. B. La figura mostra les corbes de calibratge en MH (tractat i no tractat) diluït 1/5 en PBST.....	150
Figura 4.14 Gràfiques mostrant la producció de PYO i 1-OHphz durant el creixement de les soques DKN263 (A) i DKN330 (B) de <i>P. aeruginosa</i> . La línia vermella (OD 600 nm) dona informació sobre l'estadi de creixement bacterià. El temps 0 correspon al moment en que s'inocula el medi de cultiu.....	151

- Figura 4.15 Representació de la concentració de les fenazines PYO i 1-OHphz segregades en funció de la corba de creixement de *P. aeruginosa* d'una soca provinent d'hemocultiu positiu. 152
- Figura 4.16 A. Representació gràfica del pretractament de mostres per poder mesurar 1-OHphz i PYO en una mateixa mostra. B. Representació del format indirecte competitiu de l'immunoassaig As230/PC1-BSA. C. Corbes de calibratge en PBST i efecte matriu de l'esput. 192