

CAMPO DE LA INVENCION

ESTADO DE LA TÉCNICA

Se considera que más de 140 tipos de virus entéricos pueden ser encontrados ser encontrados en fuentes hídricas (Peláez D, *et al*, 2010). Entre estos se encuentra los Rotavirus, Norovirus, Sapovirus, Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus, Reovirus (Kiulia, N. *et al*, 2015). Una investigación publicada en 2016, por el grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, sobre aguas procedentes de 102 municipios de Colombia, mostró que el 50,7% de las muestras fue positivo para algún tipo de virus entérico. La mayor prevalencia fue de virus Hepatitis A con un 26,73%, seguido de Enterovirus y Rotavirus con 20.48 % respectivamente y adenovirus (18.05%). Además, los autores reportaron que los niveles de virus en aguas crudas y potables fue muy similar (48,26% y 45,83%, respectivamente) (Peláez D. *et al*, 2016).

Una fuente hídrica contaminada con virus entéricos es de suma importancia a nivel de salud pública, ya que muchos de ellos pueden permanecer viables en las fuentes de agua, teniendo la capacidad de pasar las barreras físicas y químicas (cloro) de

los procesos convencionales de potabilización, llegando incluso a cultivos que pueden convertirse en vectores de transmisión de enfermedades.

Por tal motivo, microbiólogos, epidemiólogos y responsables de la calidad de agua, han debatido sobre la utilidad de hacer seguimiento y monitoreo a la presencia de virus como indicadores de contaminación, comprobando así la eficiencia de los procesos de potabilización. Actualmente en Colombia no existe ninguna regulación sobre virus en muestras de aguas.

Desde el punto de vista analítico, los virus son difíciles de detectar debido a que se encuentran diluidos en agua (1 a 10^3 partículas virales/Lt de agua) (Kiulia, N., y otros, 2015). Los métodos de detección de virus en muestras como el agua, están basados en métodos moleculares. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR acoplada a reverso transcriptasa (RT-PCR) y la PCR cuantitativa y en tiempo real (qPCR), son algunas de las más utilizadas y exhiben alta sensibilidad y especificidad. No obstante, existen limitantes tales como la ausencia de correlación entre el genoma viral detectado y su nivel de infectividad, haciendo necesario emplear métodos adicionales como el cultivo celular para poder identificarlos.

El cultivo celular aunque sensible también es laborioso y costoso. Además, no todos los virus son capaces de generar efecto citopático con lo cual el proceso de detección se dificulta. Incluso para algunos enterovirus como es el caso de Norovirus, no hay disponibles líneas celulares de propagación (Hamzaa IA et al, 2011).

El uso de métodos serológicos también es muy frecuente. Una de ellas es el ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA). No obstante, una de las dificultades que presenta es que detectan títulos virales elevados, requiriendo pretratamientos para concentrar los virus (Kiulia, N. et al. 2015).

Para concentrar los virus, se emplean técnicas tales como la adsorción-elución. Esta técnica se fundamenta en el uso de membranas electropositivas o electronegativas que permiten la adsorción de las partículas virales debido a las interacciones electrostáticas entre ambos. Seguidamente, son eluidos de la superficie del filtro a través de soluciones como extracto de carne, glicina o hidróxido de aluminio, que son sustancias que compiten por los sitios de unión del virus en la

membrana, liberándolos a la solución (Calgua, B et al. 2013). La principal desventaja del método es la baja recuperación viral, ya que en un estudio reportado por Fumian, T., et al, el método basado en adsorción-elución tuvo una tasa de recuperación de tan sólo el 3.5% (Fumian, T., et al, 2010).

5

Otra técnica empleada para la concentración viral es la ultrafiltración tangencial (UFT), la cual consiste en realizar una serie de filtrados en membranas de distinto tamaño de poro, dirigiendo la muestra a un filtro de flujo tangencial por medio de una bomba peristáltica de alta presión, produciendo dos fracciones: la filtrada de interés y la excluida por el filtro (Negrete, A. et al, 2014). En un estudio realizado por Alavandi et al, tras procesar 100 L de agua a través de esta técnica, se obtuvo un volumen final de 100 mL y un rango de recuperación viral que osciló entre un 7.5 a 89.61% (Alavandi et al, 2015). La técnica tiene varias limitantes. Una de ellas, es el tiempo. Se requieren 24 a 48 horas para realizar la concentración viral (Peláez, D. et al. 2010). Su aplicación también se ve limitada debido a la concentración simultánea de interferentes orgánicos e inorgánicos presentes en las muestras que no permiten que los procesos de identificación viral posteriores tales como PCR o cultivos celulares, se lleven a cabo adecuadamente, generando falsos negativos.

Con el fin de evitar estos inconvenientes, se han introducido otras técnicas de concentración. Entre estas cabe resaltar la separación inmunomagnética (IMS). El prefijo “**inmuno**” involucra el uso de anticuerpos (Ac), que son glicoproteínas en forma de “Y” las cuales son generadas por el sistema inmune de animales y humanos en presencia de una sustancia extraña o antígeno (Ag). Los Ac presentan afinidad intrínseca por el Ag que puede alcanzar hasta 10^{11} mol/L, donde el antígeno es reconocido a través de la interacción antígeno-anticuerpo (Ac-Ag) (Mortaza, I. 2013).

El sufijo “**magnética**” indica el uso de una partícula que presenta esta propiedad, cuya superficie es usada para inmovilizar anticuerpos (Ac) a través de diferentes métodos. La inmovilización debe asegurar que el Ac reconozca el antígeno y para esto debe quedar bien orientado sobre la superficie. Esto significa que la fracción constante o base de la Y quede en contacto con la superficie y los dos brazos o fracción variable quede disponible para la detección del antígeno. En este caso, se podría decir que cada anticuerpo (tipo IgG) puede unirse a dos antígenos (Villamizar R, 2009).

La propiedad magnética es aprovechada por tanto para concentrar y separar los antígenos a través de la aplicación de un campo magnético externo. La IMS ha sido propuesta para la detección selectiva de partículas virales intactas o infecciosas. Esta técnica ha sido acoplada a métodos moleculares y ha posibilitado la

5 identificación y cuantificación de virus entéricos tales como Hepatitis A (Lee, K., et al., 2012), Adenovirus (Haramoto E et al., 2010) Rotavirus (Yang W et al, 2011) a partir de diferentes muestras ambientales eliminando interferentes, incluido inhibidores de PCR.

10 Es así como, en esta patente se presenta una técnica mejorada de la IMS a la que se ha denominado **“Separación Fluoro-Inmuno-Magnética”** de partículas virales, que emplea un tipo de partícula que integra las propiedades magnéticas y de fluorescencia, para permitir eventos de separación, concentración viral y visualización en paralelo. De esta forma, se tiene un mejor control sobre el proceso

15 de detección viral. Las partículas son funcionalizadas gracias a una cubierta rica en grupos aminos presente en su superficie, lo que facilita la unión covalente del anticuerpo en posición correcta y, por tanto, la detección sensible y selectiva de diferentes tipos de virus entéricos con implicaciones a nivel de salud pública. La utilización de anticuerpos como elementos de reconocimiento asegura la detección

20 de partículas virales infecciosas sin la necesidad de emplear técnicas adicionales de cultivo en líneas celulares para evidenciar infectividad. Para confirmar la presencia del virus se hace necesario hacer extracción de material genético y para esto se emplea un kit comercial de rápida y sencilla aplicación. De esta forma, a través de la utilización de esta técnica, se abre un espectro de posibilidades en

25 detección, ya que al emplear anticuerpos específicos se puede reconocer diferentes tipos de patógenos que incluye cualquier tipo de virus entérico e incluso quistes de parásitos, los cuales también se encuentran muy diluidos en aguas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

30 La figura 1 muestra una forma esquemática del proceso de funcionalización de las micropartículas fluoro-magnéticas, en donde las partículas magnéticas poseen un core o núcleo fluorescente y una capa externa magnética la cual se encuentra modificada con grupos aminos que facilita la unión de anticuerpos monoclonales para diferentes tipos de virus entéricos (i.e. Rotavirus, Adenovirus, Hepatitis A,

35 Norovirus, Enterovirus) a través de los grupos carboxilos presentes en la fracción cristalizable (Fc) de la glicoproteína. Esto garantiza la orientación adecuada del

anticuerpo, permitiendo dos sitios para unión al antígeno. Después de cada paso de la funcionalización, las partículas son lavadas tres veces con PBS y agua destilada estéril para remover los anticuerpos que no fueron adsorbidos a las partículas.

- 5 La figura 2 muestra la Representación Esquemática del Proceso de Captura, Concentración y Separación de Virus empleando micropartículas magneto-inmuno-fluorescentes, en donde la propiedad magnética de las partículas es usada para concentrar y separar el virus de interés presente en la muestra de agua, a través de la aplicación de un campo magnético externo.

10

La figura 3 enseña la caracterización Microscopía Confocal de las Micropartículas Magnéticas. A) Micropartículas solas B) Micropartículas funcionalizadas con anticuerpo monoclonal anti-Rotavirus C) Formación de cúmulos (clústers) inducidos por la presencia de Rotavirus (10^3 partículas virales/mL) en la muestra.

15

La figura 4 es una microscopía de Fuerza Atómica A) Micropartícula Fluoro-magnética B) Partícula viral de Rotavirus C) Micropartículas Biofuncionalizadas con anti-Rotavirus D) Complejo micropartícula-anticuerpo-virus después de haber sido expuestas a 10^3 partículas virales de Rotavirus, en donde se puede evidenciar la presencia de virus sobre la superficie de las partículas, siendo más evidente la agrupación formada sobre la parte inferior adsorbidos a través de los anticuerpos.

20

La figura 5 son imágenes obtenidas con TEM empleando tinción negativa de A) Microfotografía de Micropartículas magnéticas funcionalizadas después de haber sido expuestas a 10^6 partículas virales de Rotavirus B) Micropartícula magnética B) Zoom de los Virus (Rotavirus) unidos a las micropartículas magnéticas.

25

La figura 6 corresponde a una curva de calibración realizada con concentraciones diferentes de la vacuna Rotateq (contiene 5 serotipos diferentes de Rotavirus a una concentración inicial de 10^6 PV/mL) y los datos obtenidos para la recuperación del RNA usando partículas fluoro-inmunomagnéticas de acuerdo con la presente invención.

30

La figura 7 muestra la electroforesis en gel de agarosa 1.8% que muestra la amplificación de una región de la proteína VP6 presente en la cápside de Rotavirus.

35

La figura 8 es una electroforesis en gel de agarosa 1.8% que muestra la amplificación del RNA obtenido a partir de las pruebas de selectividad y de unión no específica a micropartículas fluoro-magnéticas funcionalizadas o no con el anticuerpo anti-Rotavirus

5

La figura 9 es una representación esquemática del pretratamiento de aguas crudas previo análisis con la técnica de Separación Fluoro-Inmuno-Magnética

La figura 10 corresponde a una curva de calibración realizada en muestras de agua cruda pre-tratada, esterilizada y contaminada artificialmente con diferentes concentraciones de Rotateg

10

15

La figura 11 muestra la caracterización por microscopía de Fluorescencia de los complejos micropartículas-anticuerpo después de haber sido expuestos a aguas crudas con potencial contenido de Rotavirus y Hepatitis A

20

La figura 12 corresponde a las imágenes obtenidas con TEM empleando tinción negativa de A) Virus de la Hepatitis A (VHA) B) Rotavirus obtenidos a partir de aguas crudas

25

La figura 13 muestra la cuantificación del RNA viral obtenido a partir de muestras de agua cruda obtenidas a partir de 4 plantas de potabilización y sus respectivas fuentes hídricas abastecedoras empleando la técnica de separación Fluoro-Inmuno-Magnética

30

La figura 14 es una electroforesis en gel de agarosa 1.8% que muestra la amplificación de una región de la proteína VP6 y VP1 específicas para Rotavirus y Virus de la Hepatitis A, respectivamente separados, concentrados y detectados usando la técnica de separación Fluoro-Inmuno-Magnética a partir de aguas crudas de 4 plantas potabilizadoras y sus respectivas fuentes de abastecimiento hídrico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35

La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, consiste en funcionalizar micropartículas fluoro-magnéticas, las cuales poseen en su superficie grupos aminos que permiten la unión de forma covalente a los grupos carboxilos presentes en la fracción constante (Fc) de anticuerpos específicos para

diferentes tipos de virus entéricos (como por ejemplo Rotavirus, Hepatitis A, Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus, entre otros). La técnica comprende las siguientes etapas:

- 5 a) Hacer reaccionar una solución de micropartículas fluoro-magnéticas con anticuerpos monoclonales específicos para diferentes tipos de virus entéricos durante 30 minutos a 2 horas a una temperatura entre 33 y 37°C;
 - b) Magnetizar las micropartículas
 - c) Lavar el exceso de anticuerpo con PBS 0.15 mM con pH 7.4.
 - d) Resuspender las micropartículas funcionalizadas con los anticuerpos en PBS
10 0.15 mM conteniendo BSA y
 - e) Agregar el agua con potencial contenido viral hasta completar un (1) litro;
 - f) Hacer la inmuno-reacción durante un período entre 1 a 3 horas a temperatura ambiente con agitación constante entre 120 y 150 rpm;
 - g) Aplicar un campo magnético,
 - 15 h) Descartar el agua y recuperar los complejos magnetizados en PBS 0.15 mM con pH 7.4.
 - i) Caracterizar microscópicamente el complejo (micropartícula-anticuerpo-virus) a través de microscopía confocal y/o fluorescencia y microscopía electrónica;
 - 20
- Adicionalmente, la técnica de detección fluoro- inmunomagnética de virus entéricos en aguas también puede comprender las etapas adicionales de
- j) Choque térmico a 90°C por 15 segundos a -4°C por 15 segundos de los complejos magnetizados del paso h)
 - 25 k) Centrifugación de la solución del paso j) a 5000 rpm durante 15 minutos
 - l) Cuantificación del RNA viral del sobrenadante.

El proceso detalladamente se lleva a cabo tomando 250 µL de una solución de micropartículas fluoro-magnéticas (0.001% p/p) y se mezclan con 250 µL del
30 anticuerpo (10 µg/mL), dejándolos reaccionar durante un período de 30 minutos a 2 horas, de preferencia 1 hora a una temperatura entre 35 a 40°C, de preferencia 37°C. Seguidamente, las partículas son magnetizadas y el exceso de anticuerpo es lavado dos veces usando PBS 0.15 mM pH 7.4 conteniendo 0.1% de BSA y una vez con agua destilada estéril.

Posteriormente, las micropartículas funcionalizadas son resuspendidas en 250 µL de PBS 0.15 mM pH 7.4 y son depositadas a 1 Lt de agua con potencial contenido viral. La inmunoreacción se lleva a cabo durante un período entre 1 a 3 horas, de preferencia 2 horas a temperatura ambiente, en agitación constante, a una
 5 velocidad de entre 80 y 150 rpm, de preferencia 120 rpm. Finalmente, un campo magnético externo es aplicado con el fin de concentrar y separar el complejo. El agua es descartada y posteriormente los complejos magnetizados son recuperados en 250 µL PBS 0.15 mM pH 7.4.

10 50 µL del complejo (micropartícula-anticuerpo-virus) se caracteriza a través de microscopía confocal o de fluorescencia, para comprobar el proceso de separación inmunomagnética y la formación de agregados. En caso de existir altas concentraciones de virus en la muestra analizada, se pueden apreciar la formación de agrupaciones de partículas (clústers de 20-50 partículas).

15 El volumen restante (200 µL), es sometido a un choque térmico (90°C/15 segundos -4°C/15 segundos) para romper la interacción antígeno-anticuerpo y así liberar los viriones unidos a las partículas. Posteriormente se centrifuga a 5000 rpm/15 min y el sobrenadante se emplea para hacer extracción y cuantificación del RNA viral y
 20 de esta forma confirmar la presencia del virus. El pellet conteniendo las micropartículas es colectado y reutilizado para otros ensayos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN MUESTRAS DE AGUA ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA

OBJETIVO

Detectar Rotavirus en muestras de agua destilada estéril artificialmente contaminada, empleando la técnica de separación fluoro-inmuno-magnética.

METODOLOGÍA

1. Se preparó una solución 0.001% de las micropartículas magneto-fluorescentes y se funcionalizaron con el anticuerpo anti-Rotavirus (10 µg/mL) (Figura 1). Seguidamente, 500 µL de las micropartículas funcionalizadas fueron expuestas
 35 a 1 Lt de agua destilada estéril contaminada artificialmente con 1 a 10⁶ partículas

virales/mL. Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de separación fluoro-inmuno-magnético como se explicó en el numeral 2 (Figura 2).

2. Para comprobar la eficiencia en la separación, se llevó a cabo una caracterización por microscopía confocal de las partículas antes, durante y después del proceso de detección viral (Figura 3).

3. Adicionalmente, para verificar si la formación de agrupaciones en las partículas eran inducidas por la presencia de virus, se llevaron a cabo análisis adicionales de formación de clústers, Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y microscopía electrónica (TEM) (Figura 4-5).

4. La interacción antígeno-anticuerpo se rompió aplicando choque térmico (90°C/15 segundos-4°C/15 segundos). Posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm/15 minutos para facilitar la recuperación de los virus y la precipitación de las micropartículas fluoro-magnéticas.

5. A los virus recuperados se les realizó extracción y cuantificación de RNA. Los resultados fueron comparados con una curva patrón construida a partir del RNA obtenido directamente de la vacuna Rotateq diluida seriadamente a las concentraciones trabajadas (Figura 6).

6. El RNA extraído fue denaturado a 95 °C por 5 min y colocado inmediatamente en hielo por 5 min adicionales previo a llevar a cabo la RT-PCR OneStep Superscript III. El material genético amplificado fue revelado en electroforesis en gel de agarosa 1,8 % (Figura 7).

7. La selectividad del complejo micropartícula-anticuerpo en presencia de interferentes presentes comúnmente en el agua fue determinada. Para tal fin, se empleó una muestra de heces fecales presuntamente contaminada con poliovirus y otros virus entéricos, provista por el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS). Las micropartículas inmuno-fluoromagnéticas fueron funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus, como se describió anteriormente. Seguidamente se expusieron a 1L de agua contaminada las heces del paciente y se realizó la inmuno-reacción. Los virus concentrados fueron separados de las micropartículas magnéticas y posteriormente el RNA viral fue extraído y cuantificado. La presencia de interferentes se confirmó empleando RT-PCR OneStep Superscript III y se reveló en electroforesis en gel de agarosa 1,8 % (Figura 8). El corrido electroforético se llevó a cabo por triplicado.

8. De la misma forma, se comprobó la posible adsorción no específica al complejo micropartícula-anticuerpo. Para tal fin se tomaron micropartículas fluoro-

magnéticas sin funcionalizar, es decir, sin el anticuerpo y se depositaron a 1L de agua previamente contaminada con Rotateq (i.e. 10^6 PV/mL). La muestra fue magnetizada, lavada con agua PBS y agua destilada estéril. Posteriormente se aplicó choque térmico a fin de separar los virus unidos y se realizó extracción de RNA. La presencia de interferentes se confirmó empleando RT-PCR OneStep Superscript III y se reveló en electroforesis en gel de agarosa 1,8 % (Figura 8). El corrido electroforético se llevó a cabo por triplicado.

RESULTADOS

En la figura 3A se aprecian las micropartículas magnéticas antes del proceso de funcionalización. Se puede evidenciar que las micropartículas se encuentran dispersas en el medio. Esto se debe a la repulsión electrostática que se genera por la carga positiva de los grupos aminos presentes en la superficie de las partículas. En la figura 3B, se aprecian las micropartículas funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus. Puede observarse pequeños agregados de micropartículas (2 o 3 partículas) debido a la diferencia de cargas de los aminoácidos que componen el anticuerpo. Finalmente, en la figura 3C, se observa la formación de grandes agrupaciones (grupos de 5 a +30 partículas) como consecuencia de la exposición de las micropartículas a altas concentraciones del virus (10^6 partículas Rotateq/mL). La presencia del virus hace que las partículas se auto-ensamblen, generando agrupaciones (clústers) que varían de tamaño en función de la cantidad de virus presentes en la muestra. Este evento ha sido previamente descrito por Pérez JM y colaboradores (Pérez JM et al, 2003).

Para confirmar que la formación de agregados era mediada por virus, se llevó a cabo la caracterización a través de Microscopía de Fuerza Atómica. A través de esta técnica se determinó un diámetro inicial de las micropartículas de 562 nm (Figura 4A), lo cual se corresponde con la ficha técnica del producto. Una vez las micropartículas fueron funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus, su diámetro aumentó aproximadamente en 10 nm (Figura 4C). La altura de una IgG es de 12 nm en posición vertical, esto significa, con la región Fab apuntando al analito. No obstante, debido al mecanismo de absorción sobre los grupos aminos, se pueden presentar rotación de la biomolécula permitiendo movimientos rotacionales (Tronin, A. et al., 1995) que generan variaciones en los valores (i.e. desde 10 nm a 12 nm).

Después de que las partículas funcionalizadas fueron expuestas al virus incrementaron significativamente su diámetro. La figura 4B muestra que una partícula viral de Rotavirus, alcanza un diámetro promedio de 100 nm, mientras que en la figura 4D puede evidenciarse la formación de un cúmulo de virus adsorbido a la superficie de las partículas funcionalizadas. Allí los virus son detectados a través de la interacción antígeno-anticuerpo mediada por fuerzas supramoleculares.

Muestras de la misma naturaleza fueron caracterizadas por microscopía de transmisión electrónica (TEM) con el fin de visualizar mejor el complejo y comprobar la presencia de los virus. En la figura 5, puede apreciarse la morfología de una micropartícula magnética, de una partícula de Rotavirus y del complejo micropartícula-anticuerpo-virus, confirmando así los hallazgos obtenidos a través de la caracterización con AFM.

La caracterización molecular permitió confirmar la presencia de Rotavirus. La figura 6 muestra la curva de calibrado empleando un stock de Rotateq a diferentes concentraciones (i.e. 10 a 10^6 partículas virales) y el RNA recuperado de los mismos stocks diluidos en 1 Lt de agua empleando las micropartículas fluoro-inmuno-magnéticas. Se puede apreciar que a mayor contenido viral mayor cantidad de RNA viral en las muestras.

De igual forma, se puede apreciar en la gráfica, que los virus diluidos en 1 Lt de agua son eficientemente separados y concentrados, con porcentajes de recuperación promedio de 80.68 %. Lo anterior indica que en muestras de agua potable o pura existen muy pocos interferentes capaces de reducir la detección viral.

Además, se quiso comprobar que el RNA extraído, efectivamente perteneciera a Rotavirus y no a posibles interferentes de la matriz absorbidos de forma no específica a las micropartículas. De esta forma se procedió a amplificar y revelar el material genético. La figura 7 muestra el marcador de peso molecular, un control negativo (C-) y el control positivo (C+) correspondientes al segmento de 211 pb de la proteína de cápside VP6. Los pozos 7, 8 y 9 muestran las bandas obtenidas para 10^1 PV, 10^3 PV y 10^6 PV de Rotateq diluidos en 1 litro de agua, separados y concentrados por separación fluoro-inmunomagnética mientras que los pozos 12 al 14, muestran las bandas obtenidas para las mismas concentraciones virales hechas concentradas por ultrafiltración tangencial (UFT) como método de referencia. Los

resultados permitieron evidenciar que la técnica de Separación Fluoro-inmuno-
magnética es tan efectiva como la UFT en la concentración viral. Además presenta
la gran ventaja de requerir solo 2 horas para hacer la concentración del virus y de
no necesitar pasos posteriores de cultivo celular para determinar la infectividad de
5 las partículas virales detectadas.

En cuanto a la prueba de selectividad, se logró hacer la concentración y separación
de partículas virales. Al realizar la extracción de material genético se obtuvo un total
de 17.9 ng/μl de RNA viral. Este mismo fue amplificado y revelado. Las bandas
10 ubicadas en los pozos 1 y 2 fueron muy tenues. No obstante, la banda ubicada en
el pozo 3 del corrido electroforético, se correspondió con el segmento 211 pb de la
proteína de cápside VP6. Por tanto, se concluyó que la muestra tomada para
análisis contenía entre otros virus entéricos, Rotavirus, que hizo que el anticuerpo
monoclonal lo reconociera y posteriormente, a través de la técnica empleada se
15 pudiera concentrar, separar y detectar (Figura 8).

Finalmente, los ensayos de adsorción no específica evidenciaron la alta
especificidad del complejo ya que se logró cuantificar tan solo 0.6 ng/μL de RNA
después de emplear solo las micropartículas fluoro-inmunomagnéticas sin
20 anticuerpo y expuestas a Rotavirus. En la amplificación y revelado no se logró
evidenciar la presencia de ningún virus perteneciente al género Rotavirus (Figura 8-
pozos 4-6). Este ensayo mostró que en ausencia del elemento de reconocimiento
(anticuerpo anti-Rotavirus) no se dan eventos de adsorción inespecífica sobre el
complejo, lo cual puede atribuirse al uso del buffer de bloqueo empleado al cual se
25 le adicionó BSA.

Ejemplo 2: DETECCIÓN DE ROTAVIRUS Y HEPATITIS A EN MUESTRAS DE AGUA CRUDA PROVENIENTE DE 4 PLANTAS DE POTABILIZACIÓN DEL DEPARTAMENTO NORTE DE SANTANDER

OBJETIVO

Determinar la eficiencia de la técnica de separación fluoro-inmunomagnética en la
detección de virus entéricos en matrices complejas.

METODOLOGÍA

TOMA DE MUESTRAS-PRETRATAMIENTO

Se realizó muestreo compuesto de aguas crudas provenientes de cuatro plantas de tratamiento ubicadas en el departamento Norte de Santander, tanto en la etapa de captación, así como de la fuente de procedencia (Río Pamplonita y Río Zulia). Las muestras fueron recogidas en frascos de vidrio estériles y se transportaron al laboratorio para su procesamiento. Debido a la naturaleza de la muestra (aguas crudas con altas concentraciones de materia orgánica), se realizó un pretratamiento que consistió en realizar dos procesos sucesivos de filtración de material grosero empleando algodón y posteriormente una centrifugación a 3500 rpm/10 minutos como se muestra en la figura 9.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Una muestra de agua compuesta, obtenida a partir de la mezcla de 250 mL de agua cruda pre-tratada de cada una de las plantas fue esterilizada con calor húmedo a 121°C/15 min con el fin de eliminar posible presencia de contaminantes biológicos y virológicos. Las muestras de agua fueron contaminadas artificialmente con 1 a 10⁶ partículas virales/mL de Rotateq con el fin de realizar una curva de calibración que se comparó con el stock del virus sin diluir en agua cruda pretratada y determinar así los porcentajes de recuperación viral en matrices complejas. Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de separación fluoro-inmuno-magnético y caracterización molecular como se explicó en el numeral 2.

ENSAYOS DIRECTOS EN AGUAS CRUDAS

Se tomaron muestras de 1 Lt de agua proveniente de cada planta de potabilización, así como de su fuente de procedencia, se filtraron (con papel filtro y algodón), se centrifugaron y se le adicionaron micropartículas fluoro-magnéticas con anticuerpos monoclonales anti-Rotavirus y anti-Hepatitis siguiendo los mismos pasos explicados en el numeral 2. La inmunoreacción se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el numeral 2 al igual que la concentración y la separación fluoro-inmuno-magnética. Los complejos fueron caracterizados por microscopía de fluorescencia para determinar la presencia de clústers. Además, la presencia de los virus fue evidenciada a través de microscopía electrónica y mediante caracterización molecular, realizando la extracción, cuantificación, amplificación y revelado por electroforesis de las partículas virales.

RESULTADOS

Se puede apreciar en la figura 10 los valores obtenidos para la extracción de RNA viral a partir de aguas crudas y comparados con el patrón. Estadísticamente los datos fueron ajustados a través del modelo de regresión lineal donde se obtuvo un $R^2=0.923$, lo que indica que se encuentra en el intervalo $0,9 \leq R^2 < 1$, para una correlación excelente entre los datos.

Se pudo establecer que, debido a la naturaleza compleja de la muestra, el nivel de sensibilidad de las partículas fluoro-inmuno-magnéticas disminuye en promedio un 36.51% con respecto a los ensayos realizados en agua destilada estéril y presentados en el ejemplo 1 (Figura 6). No obstante, el porcentaje de virus recuperados es de 44,17% se encuentra por encima de otros estudios tales como el reportado por Haramoto E, en el que detectaron Norovirus humanos en muestras de agua de río empleando procesos de adsorción-elución usando filtros electronegativos, obteniendo porcentajes de recuperación del 15% (Haramoto E et al, 2009), mientras que el reportado por Fumian et al, solo alcanzó un 3.5 % en la misma matriz usando un método similar (Fumian et al, 2010). Comparando directamente con otros estudios en el que emplearon separación inmunomagnética (IMS), Ha J et al, reporta la recuperación del virus de la Hepatitis A y Norovirus a partir de alimentos mínimamente procesados alcanzando niveles promedio de 6.2 % y 8.5 %, respectivamente (Ha J et al, 2014). La técnica aquí desarrollada muestra que los niveles de sensibilidad alcanzada son debidos probablemente a la eficiencia del pretratamiento aplicado a las muestras antes de ser aplicado el complejo micropartícula-anticuerpo y la correcta adsorción del mismo a las partículas. Ya que asegurando que los anticuerpos tengan los dos sitios de unión al antígeno orientados en la posición adecuada se aumenta la sensibilidad en la detección.

La caracterización por microscopía de fluorescencia de los complejos virales tanto con Rotavirus como con Hepatitis A en las muestras de agua provenientes de las 4 plantas de potabilización del departamento, permitió evidenciar la presencia de clúster en todos los casos (Figura 11A-B).

Posteriormente, se rompió la interacción antígeno-anticuerpo para facilitar la liberación de las partículas virales, las cuales fueron caracterizadas a través de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) (Figura 12). El virus de la hepatitis A (VHA) comparte rasgos morfológicos y estructurales básicos de otros grupos de

la familia, como los enterovirus. Estructuralmente es circular, no envuelto con un tamaño de aproximadamente 30 nm de diámetro (Figura 12A). De otra parte, Rotavirus es un virus que presenta cápside icosaédrica, no envuelto de 50 a 65 nm de diámetro rodeada por una capa doble que confiere al virus aspecto de rueda, de ahí el nombre rotavirus. La triple capa proteica hace que el virus tenga un diámetro total de unos 80 nm de diámetro (Figura 12B).

Además, se realizó extracción y cuantificación de RNA viral de los dos virus (Figura 13) y para el caso de Rotavirus, los datos obtenidos se reemplazaron en la ecuación de la recta presentada en la figura 10. Se pudo determinar que este virus se encuentra en una concentración que oscila entre 6×10^5 PV/mL hasta $1,35 \times 10^6$ PV/mL en las diferentes muestras de aguas crudas analizadas provenientes de las 4 plantas de tratamiento analizadas incluyendo sus fuentes de abastecimiento.

La figura 14 muestra las bandas correspondientes a un segmento de la proteína VP6 presente en la cápside de Rotavirus y de un segmento de 192 pb correspondientes a la una región entre VP1 y 2A presentes en la cápside del VHA. Estos hallazgos permitieron comprobar la eficiencia de la técnica a la hora de detectar partículas virales de Rotavirus y Virus de la Hepatitis A en matrices complejas. El VHA es un virus altamente contagioso que presenta dosis infectivas bajas. Este es un virus entérico exhibe su tropismo por las células epiteliales de aparato digestivo, de donde se desplaza a través del torrente sanguíneo al hígado, órgano afectado responsable de producir la conocida "Hepatitis infecciosa".

Los anticuerpos monoclonales acoplados a las micropartículas magnéticas, permitieron el reconocimiento del antígeno VP1 presente en la cápside viral, lo que facilitó su concentración, separación y posterior detección en muestras de agua procedentes de la etapa de captación de 3 de las 4 plantas de potabilización analizadas (CAR, MON y POR) y en el agua proveniente del río Zulia, fuente hídrica que abastece de agua a una de las plantas estudiadas.

En el caso del género *Rotavirus* este se encuentra dividido en siete grupos serológicos que van desde el A al G, los cuales a su vez presentan varios subgrupos. El grupo A al C son patógenos para humanos, mientras que los restantes tienen más afinidad por animales. El grupo A es el más patógeno y frecuente en humanos. A través de la técnica de separación fluoro-

inmunomagnética, se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para la detectar el epítipo VP6 en la cápside viral de Rotavirus del grupo A. Los análisis realizados permitieron identificar su presencia en todas las fuentes de captación de las 4 plantas de potabilización analizadas y en las muestras de agua provenientes de los ríos Pamplonita y Zulia. Este hallazgo sin duda, genera un potencial riesgo para la salud pública de la población que emplea este tipo de aguas para recreación, riego e incluso consumo sin tratamientos adecuados de desinfección. La razón radica en el hecho de que este virus presenta una estructura morfológica basada en una triple capa protéica, lo que hace que sea catalogado como un virus altamente resistente a los procesos de cloración del agua en comparación con otros virus entéricos (OMS-Guías para la calidad del agua potable). Por tanto, procesos deficientes de desinfección del agua podrían permitir que el virus llegara a los consumidores a través de agua que puede estar desde el punto de vista bacteriológico, apta para el consumo humano.

CONCLUSIÓN

Se puede concluir que la técnica fluoro-inmunomagnética desarrollada permite la detección de Rotavirus y Hepatitis A, en muestras de agua estéril contaminada artificialmente, así como en matrices complejas tales como aguas crudas. La técnica presenta unas características de realización interesantes (Tabla 1), que la hacen atractiva para su aplicación en la detección de cualquier patógeno que se encuentre diluido en agua incluyendo quistes de parásitos, siempre que se empleen anticuerpos específicos.

REFERENCIAS

- Alavandi, S., Bharathi AR., Kumar S., Dineshkumar N., Saravanakumar C., Rajan JS. Tangential flow ultrafiltration for detection of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp pond water. Journal of Virological Methods. 2015. 218: 7-13
- Calgua B, Fumian T, Rusiñol M, Girones R. Detection and quantification of classic and emergin viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. Water Research. 2013. 47: 1797-2810
- Fumian TM, Leite JP, Castello AA, Gaggero A, Caillou MS, Miagostovich MP. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. Journal of Virology Methods. 2010. 170(1-2):42-6.

- Ha, JH, Choi, C., Ha, SD. Evaluation of Immunomagnetic Separation Method for the Recovery of Hepatitis A Virus and GI.1 and GII.4 Norovirus Strains Seeded on Oyster and Mussel. *Food and Environmental Virology*. 2014. 6:290-296.
- Haramoto E., Kitajima M, Katayama H, Ohgaki S. Real-time PCR detection of
 5 adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Research*. 2010. 44:1747–1752.
- Hamzaa I, Jurzik L, Überlab K, Wilhelm M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2011. 214: 424– 436.
- 10 Kiulia NM, Hofstra N, Vermeulen LC, Obara MA, Medema G and Rose JB. Global Occurrence and Emission of Rotaviruses to Surface Waters. *Pathogens*. 2015. 4: 229-255.
- Lee JH, Cheol G., Kimc JI., Yic HA, Lee CH. Development of a new cell culture-based method and optimized protocol for the detection of enteric viruses. *Journal of*
 15 *Virological Methods*. 2013. 191: 16– 23.
- Mortaza I. Analytical applications of chemiluminescence-detection systems assisted by magnetic microparticles and nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry*. 51
 2013. 51–70.
- Negrete, A., Pai, A., Shiloach, J. Use of hollow fiber tangential flow filtration for the
 20 recovery and concentration of HIV virus-like particles produced in insect cells. *Journal of Virological Methods*. 2014. 195: 240–246.
- Peláez D, Rodríguez JA, Rocha EL, Rey GJ. Estandarización de un método de concentración y detección de virus entéricos en aguas de consumo. *Biomédica*. 2010.30:2
- 25 Peláez D, Guzmán BL, Rodríguez J, Acero F, Nava G. Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: desafíos de los sistemas de abastecimiento. *Biomédica*. 2016: 36:169-78.
- Perez JM, Simeone FJ, Saeki Y, Josephson L, Weissleder R. Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles
 30 in biological media. *Journal of Analytical Chemistry Society*. 2003. 125, 10192-10193.
- Tronin, A., Dubrovsky, T., Nicolini, C. Comparative Study of Langmuir Monolayers of Immunoglobulin G Formed at the Air-Water Interface and Covalently Immobilized on Solid Supports. *Langmuir*. 1995. 11, 385–389.
- 35 Villamizar R, 2009. Biosensors base on carbón nanotube field effect transistors for detecting pathogenic microorganisms. *Universitat Rovira I Virgili*. ISBN:978-84-692-

9761-2/DL:T-203-2010. Disponible en www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9037/Villamizar.pdf

Yang W, Gu AZ, Zeng SY, Li D, He M, Shi HC. Development of a combined immunomagnetic separation and quantitative reverse transcription-PCR assay for sensitive detection of infectious rotavirus in water samples. Journal of Microbiological Methods. 2011. 84:447–453

Organización Mundial de la Salud OMS 206. Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1: Recomendaciones. Tercera edición. ISBN 92 4 154696 4. Disponible en: www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es

Tabla 1. Parámetros de realización de la técnica

PARÁMETRO DE REALIZACIÓN	RESULTADO
Tiempo de Detección	2 horas
Sensibilidad	>80 %
Límite de Detección	10 partículas virales/1L agua crudas o potables
Sencillez	El procedimiento de funcionalización de la micropartícula magnética y de concentración de virus a partir de la muestra de agua se da en dos pasos y no requiere de ligandos químicos
Selectividad	Se detecta un solo grupo de virus debido al uso de anticuerpos monoclonales y estos mismos facilitan la detección de partículas virales completas infectivas, por lo cual no se hace necesario técnicas adicionales de detección tales como cultivo celular
Costo	Se puede hacer producción en masa de anticuerpos policlonales en modelos murinos para disminuir costos

Nota: Cabe destacar que todos los resultados obtenidos fueron validados por el grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS) quienes son referentes de este tipo de análisis en agua en el país.

P-11147 (Solicitud No. NC2016/0005568)
Reivindicaciones Modificadas – RTA AO 12429
14 de enero de 2019

5

REIVINDICACIONES

1. Una técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos
seleccionado de adenovirus, astrovirus, enterovirus, virus Hepatitis A, norovirus,
rotavirus, entre otros puede ser detectado en aguas; la técnica comprende las
siguientes etapas:
 - a) Hacer reaccionar una solución de micropartículas fluoro-magnéticas con
anticuerpo durante 30 minutos a 2 horas a una temperatura entre 33 y 37°C
 - b) Magnetizar las micropartículas;
 - c) Lavar el exceso de anticuerpo con PBS 0.15 mM pH 7.4;
 - d) Resuspender las micropartículas funcionalizadas en PBS 0.15 mM
conteniendo BSA; y
 - e) Agregar el agua con potencial contenido viral hasta completar un (1) litro;
 - f) Hacer la inmunoreacción durante un período entre 1 a 3 horas a temperatura
ambiente con agitación constante entre 120 y 150 rpm;
 - g) Aplicar un campo magnético;
 - h) Descartar el agua y recuperar los complejos magnetizados en PBS 0.15 mM
pH 7.4;
 - i) Caracterizar microscópica y molecularmente el complejo (micropartícula-
anticuerpo-virus).
2. La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, de
acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque: en la etapa a) la
concentración de las micropartículas-fluoromagnéticas es de 0.001% p/p y la
concentración del anticuerpo es de 10 µg/mL.
3. La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, de
acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la etapa C) se lleva a
cabo una vez con PBS 0.15 mM pH 7.4, una vez con PBS 0.15 mM pH 7.4
conteniendo 0.1% de BSA y una vez con agua destilada estéril.
4. La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, de
acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque
la etapa de caracterización se lleva a cabo mediante Microscopía Confocal o
Microscopía de Fluorescencia, Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y/o
Microscopía Electrónica (TEM).

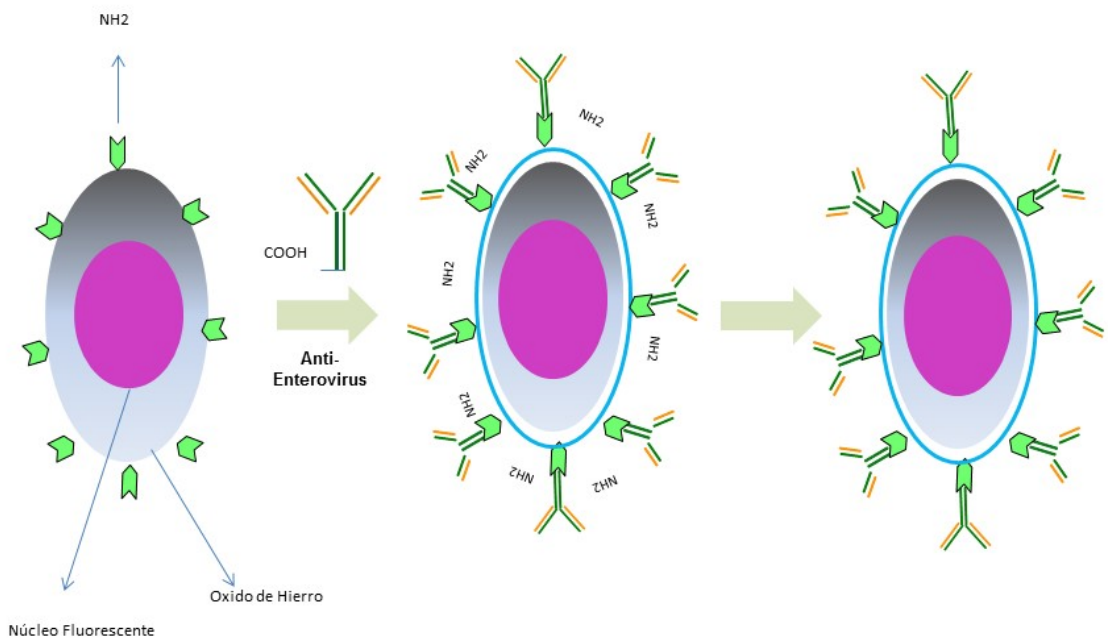
5. La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende las etapas adicionales:

- 5 j) Choque térmico a 90°C por 15 segundos a -4°C por 15 segundos de los complejos magnetizados del paso h)
- k) Centrifugación de la solución del paso j) a 5000 rpm durante 15 minutos
- l) Cuantificación del genoma viral a partir del sobrenadante.

RESUMEN

La invención se encuentra dirigida a una técnica de detección de virus entéricos en aguas, que emplea micropartículas que poseen propiedades magnéticas y al mismo tiempo de fluorescencia. Para tal fin, se hace reaccionar una solución de micropartículas fluoro-magnéticas con anticuerpos monoclonales, las cuales son expuestas a la presencia del patógeno el cual se encuentra diluido en 1 litro de agua. Posteriormente los patógenos son magnetizados a través de la aplicación de un campo magnético externo que posibilita la concentración, separación y posterior detección a través de técnicas sencillas de microscopía y/o moleculares.

FIGURAS



5

FIG 1

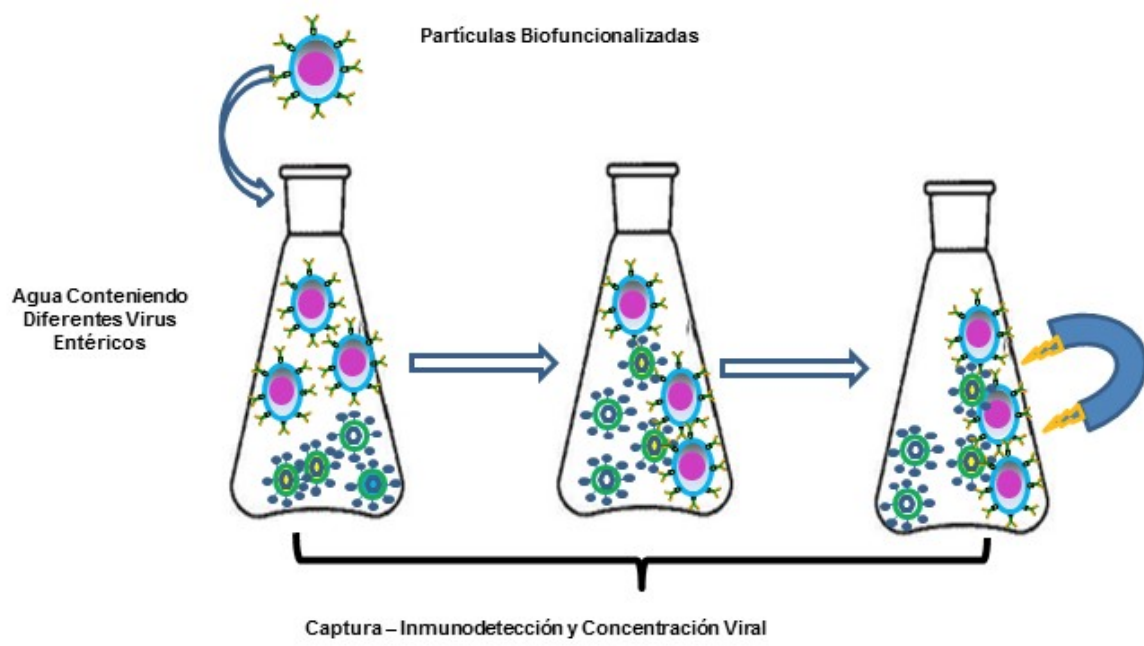
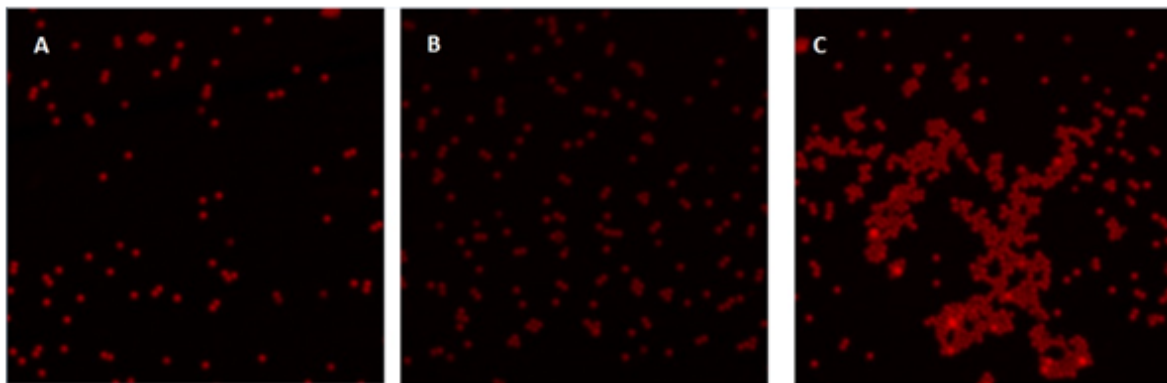


FIG 2

**FIG 3**

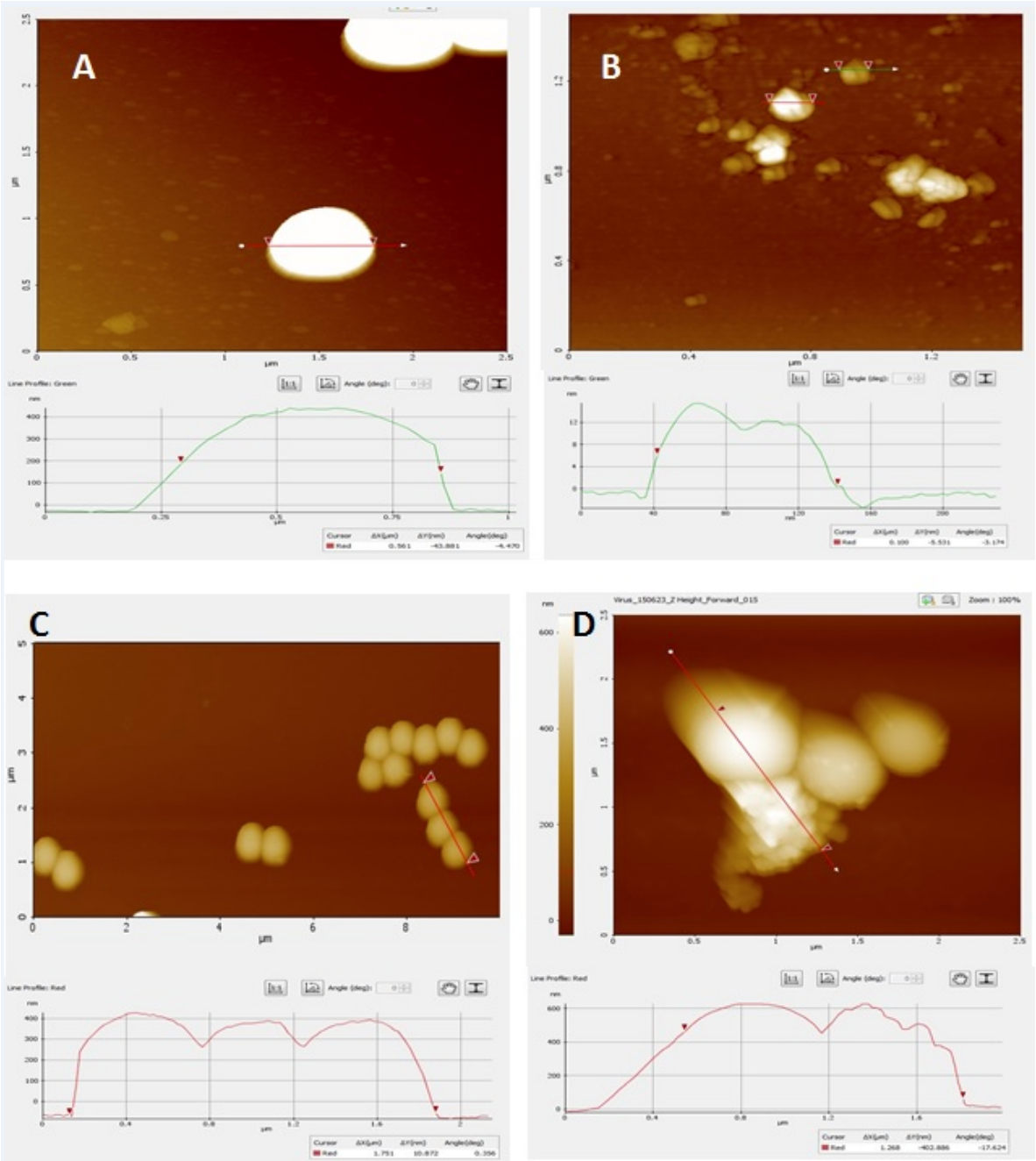


FIG 4

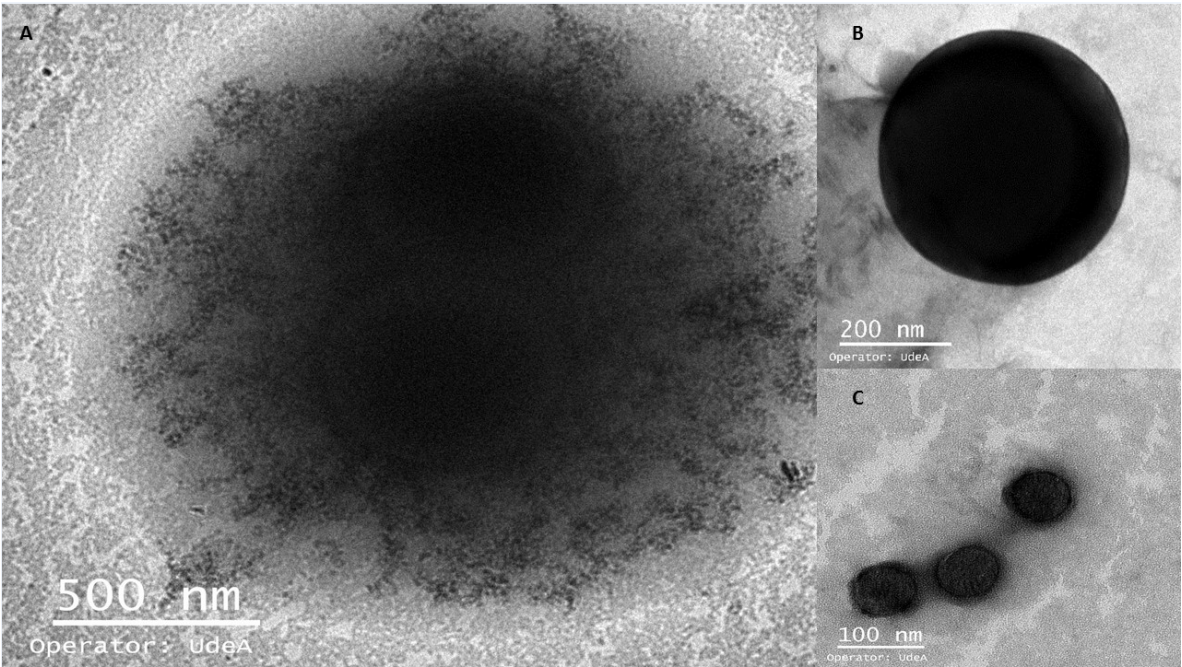


FIG 5

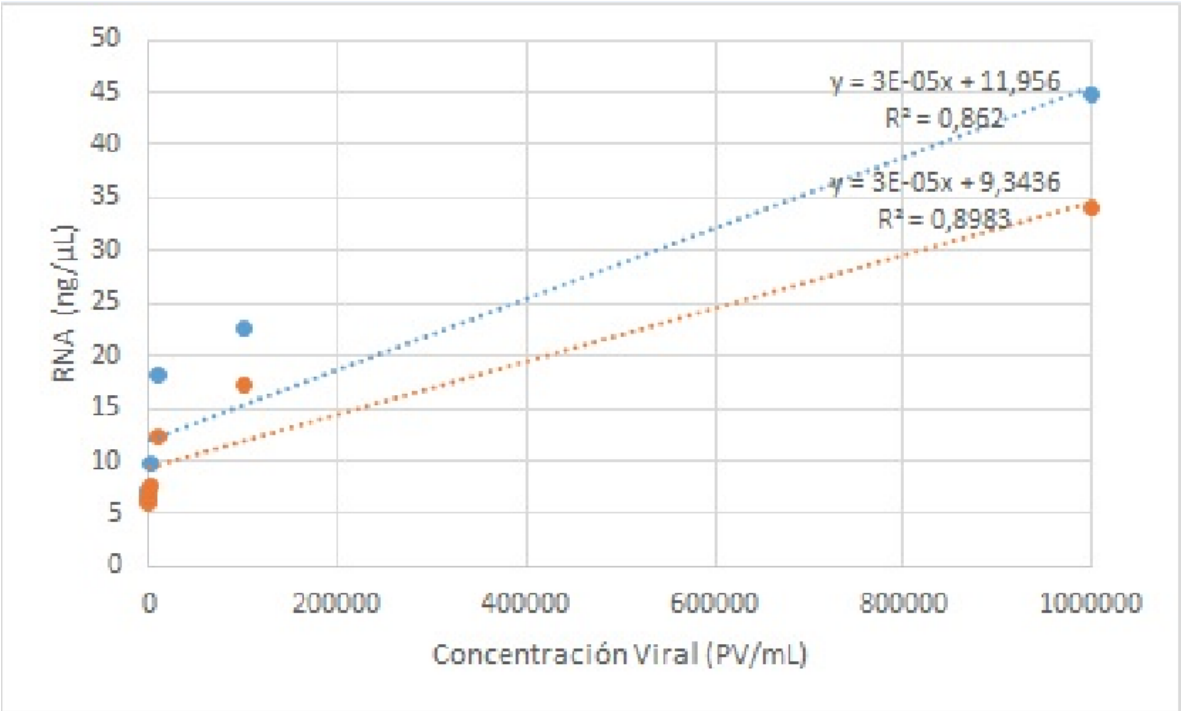


FIG 6

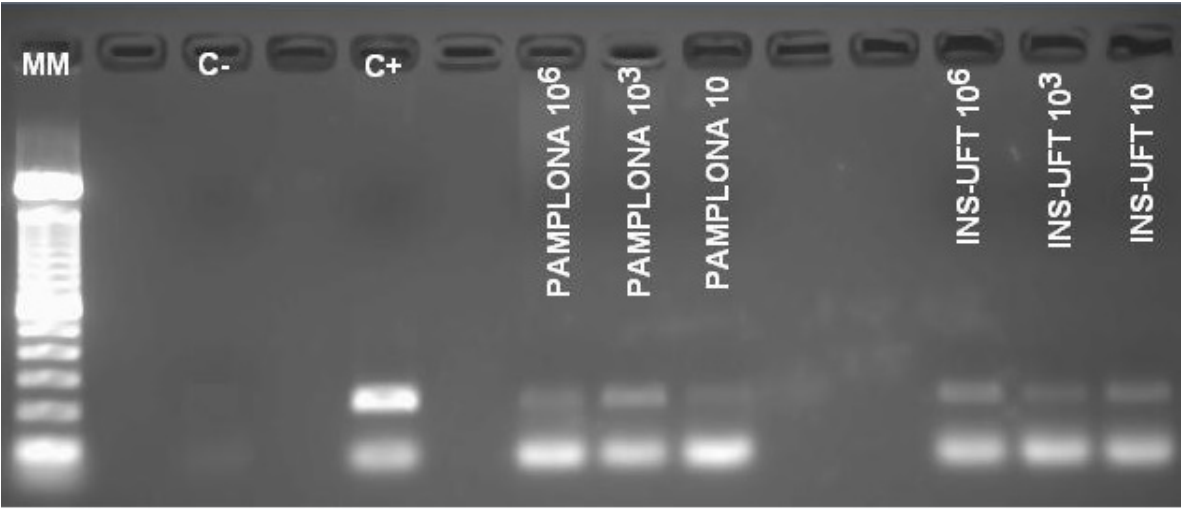


FIG 7

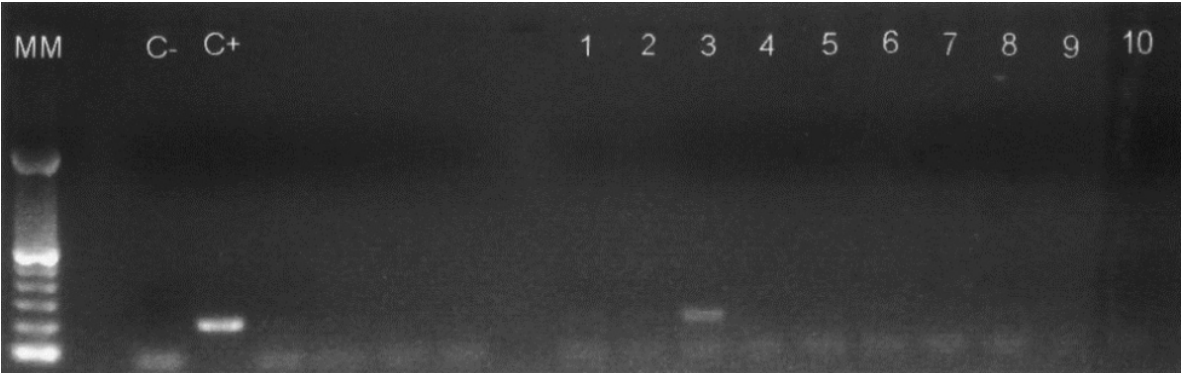
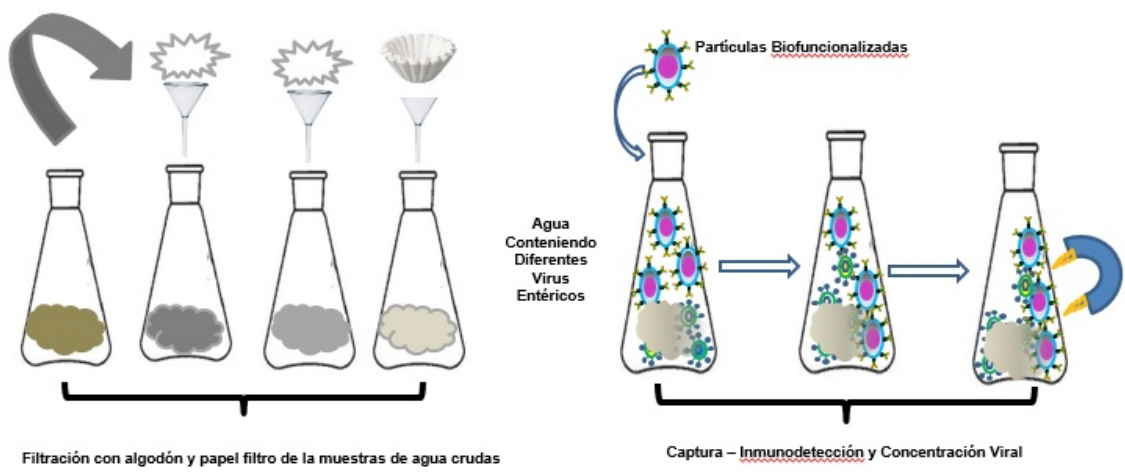


FIG 8



5

FIG 9

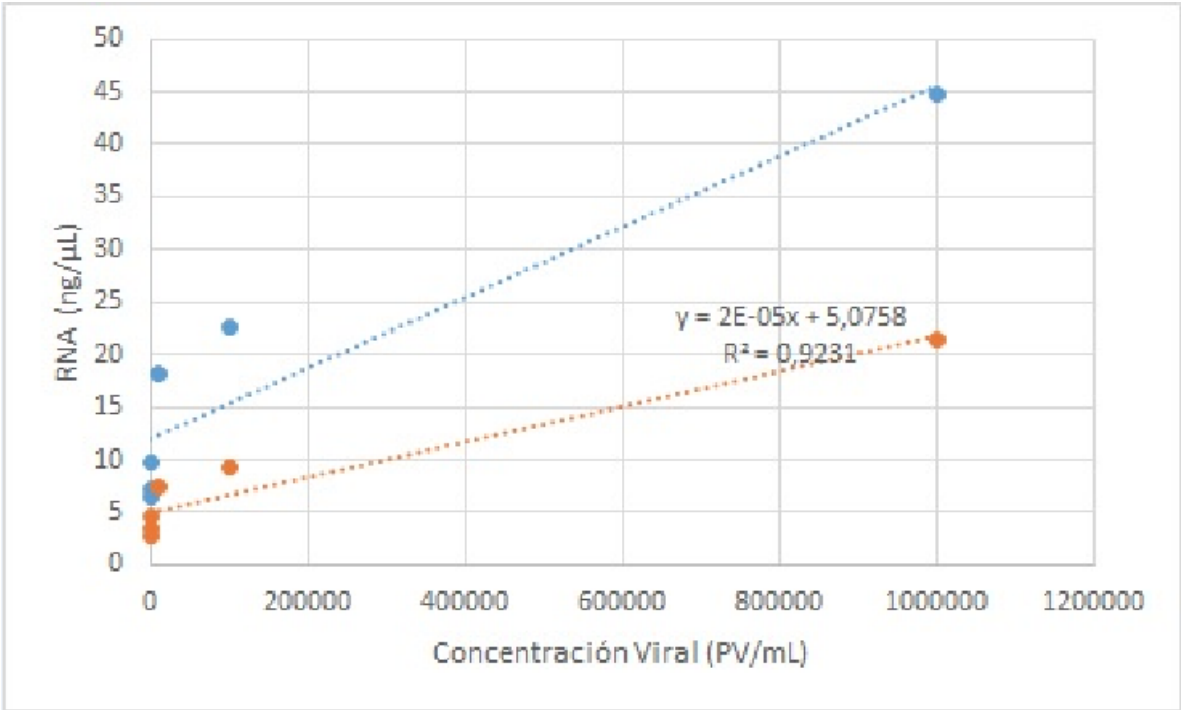
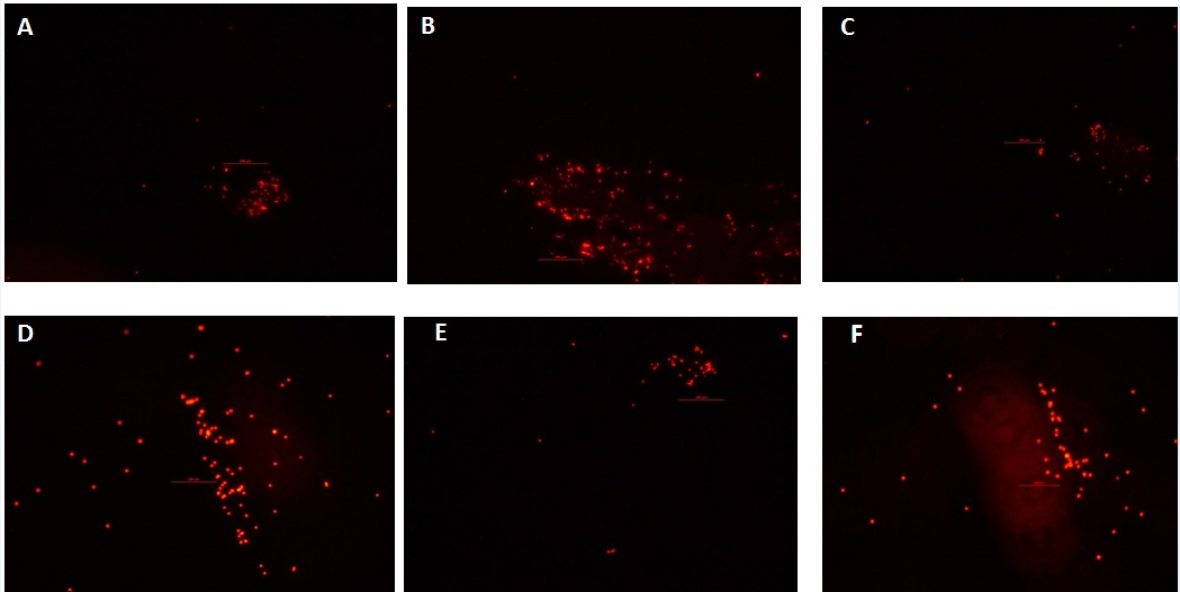
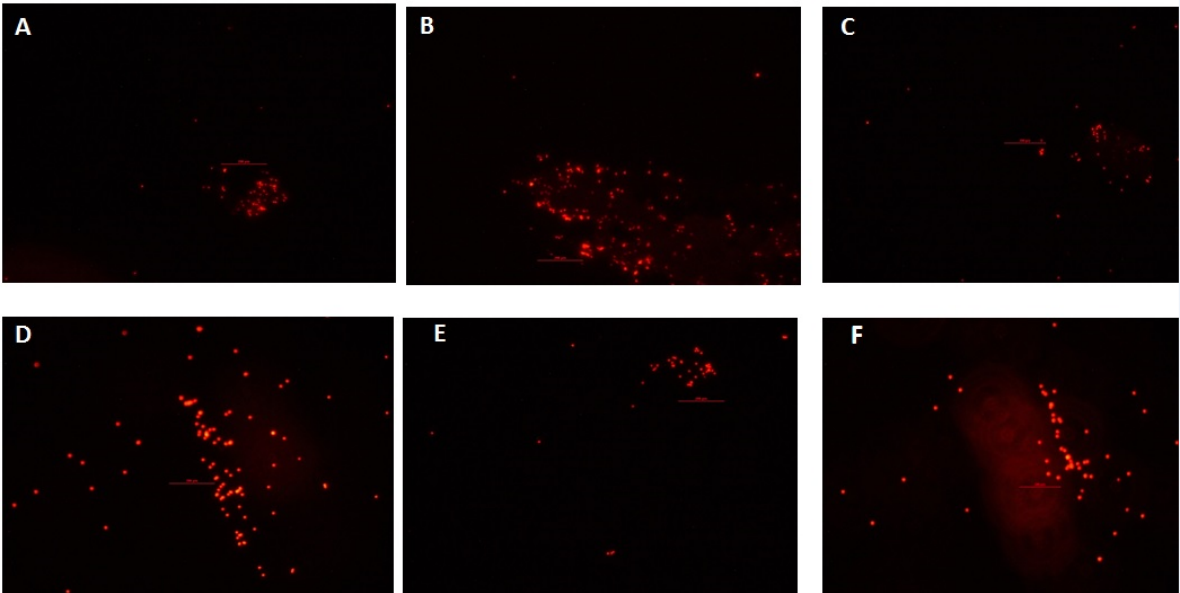


FIG 10



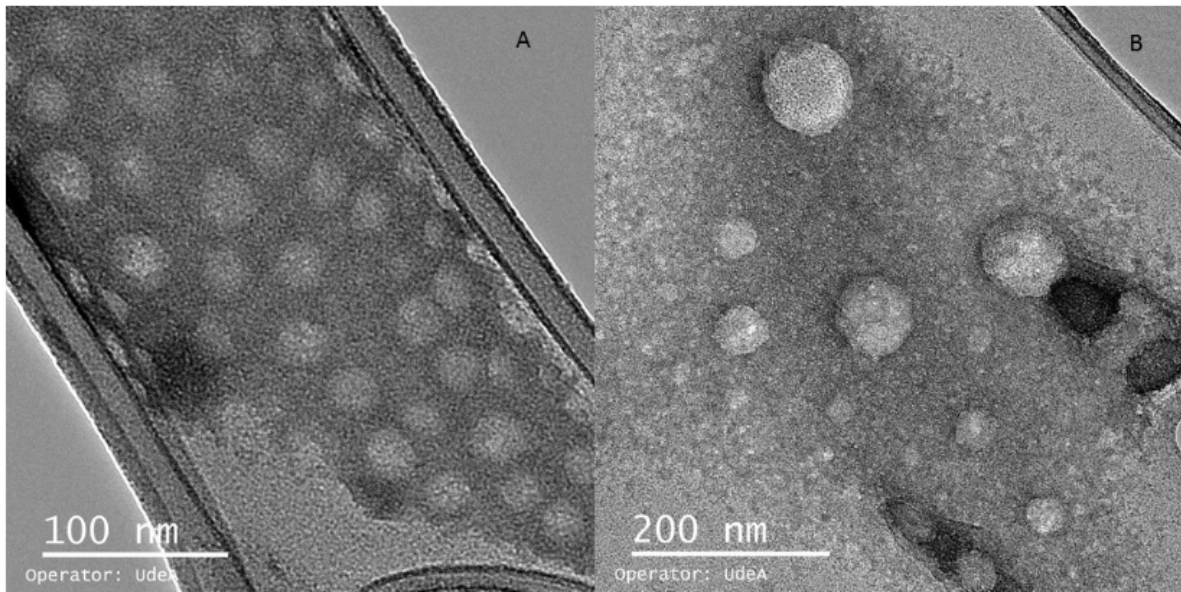
5

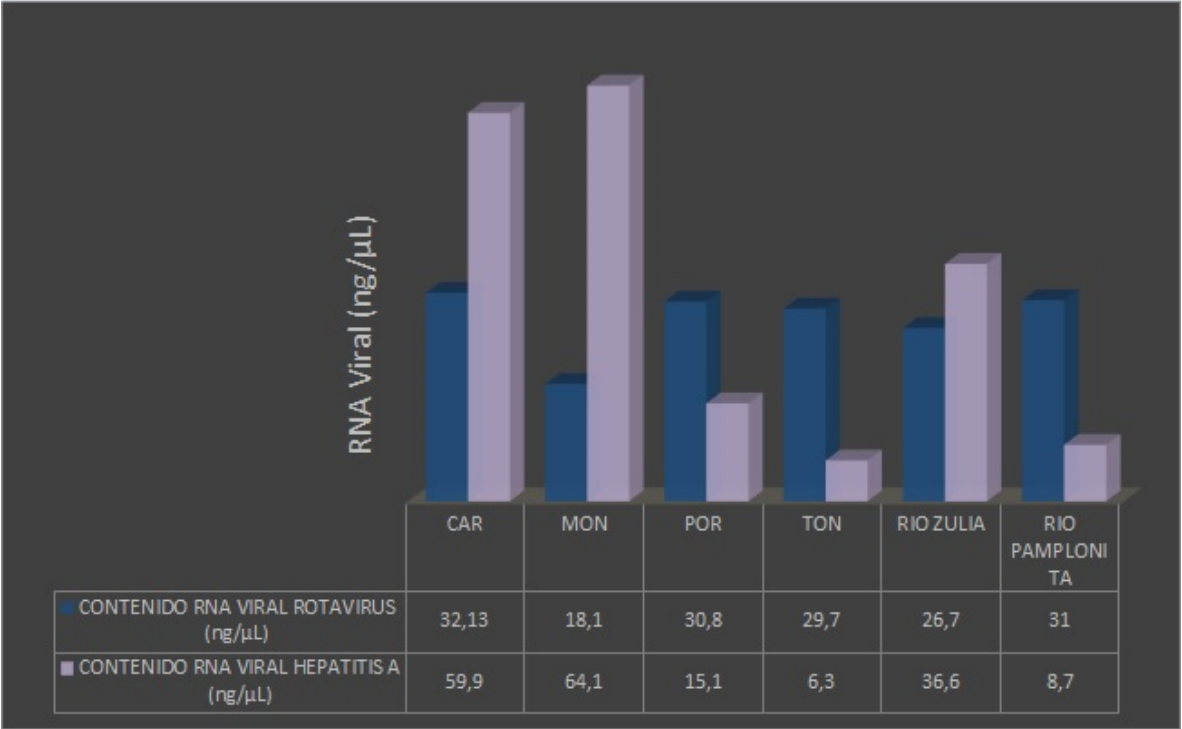
FIG 11A



10

FIG 11B

**FIG 12**



5

FIG 13

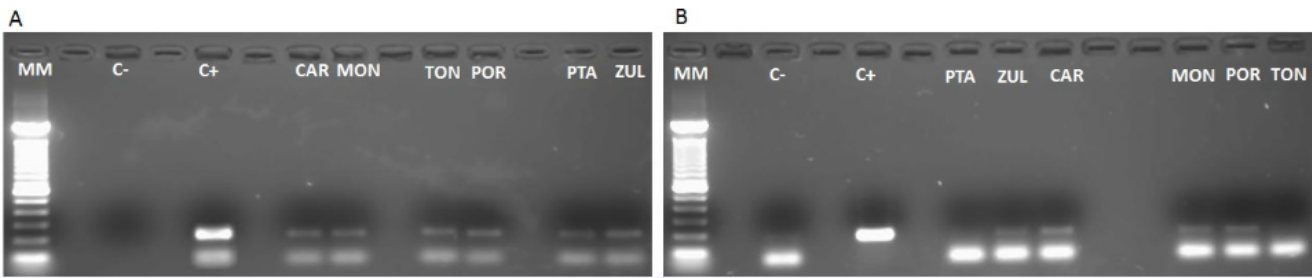


FIG 14

P-11147

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2016/0005568**

Solicitud de patente a nombre de **UNIVERSIDAD DE PAMPLONA**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 3, obrando como apoderada de la sociedad UNIVERSIDAD DE PAMPLONA, domiciliada en Pamplona – Norte de Santander, Colombia, Solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **12429** notificado electrónicamente el 17 de octubre de 2018, relacionado con concepto técnico de fondo, atentamente me permito informar que, con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, se realizan las siguientes modificaciones:

1. Modificaciones presentadas

De acuerdo con el ítem 2 del oficio que se contesta, las modificaciones de la descripción y las reivindicaciones bajo radicado NC2016/0005568 del 13 de julio de 2018, no son aceptables porque amplían el objeto de la solicitud. Ante ello, contrario a la opinión del Examinador respetuosamente manifestamos nuestro completo desacuerdo y expresamos que dicho concepto es incorrecto, toda vez que las modificaciones realizadas y presentadas el 13 de julio de 2018 bajo radicado NC2016/0005568 se encuentran debida y claramente soportadas en la memoria descriptiva inicialmente presentada, tal como se indica a continuación:

- **Comentario Examinador:** *“porque mencionan que la invención se trata de micropartículas y en la descripción original se mencionó el término partículas”* (Pág. 2); *“el solicitante no menciona en la descripción “micropartículas... por lo que este Despacho no tiene en cuenta estas características al considerarse no sustentadas”* (Pág. 7).

Aunque el término “*micropartícula*” no es mencionado continuamente, a lo largo del capítulo descriptivo se indica que la invención se trata de “*micropartículas*” al

recitar en el capítulo descriptivo inicialmente presentado, por ejemplo (énfasis nuestro):

- “La figura 1 muestra una forma esquemática del proceso de funcionalización de las micropartículas fluoro-magnéticas, en donde las partículas magnéticas...” (Pág. 4, líneas 30-31);
- “La figura 3 enseña la caracterización Microscopía Confocal de las Partículas Magnéticas... B) Micropartículas funcionalizadas con anticuerpo monoclonal anti-Rotavirus...” (Pág. 5, líneas 12-13);
- “La presente invención está dirigida a una técnica de detección fluoro- inmunomagnética de virus entéricos en aguas que comprende las siguientes etapas:
 - a) Hacer reaccionar una solución de partículas fluoro-magnéticas con anticuerpo durante 30 minutos a 2 horas a una temperatura entre 33 y 37°C; (...)
 - i) Caracterizar microscópica y molecularmente el complejo (micropartícula-anticuerpo-virus)” (Pág. 7, líneas 5 a 18; Reivindicación 1);

Si la etapa i) trata de caracterizar el complejo micropartícula-anticuerpo-virus, es completamente claro que en el tipo de partícula utilizado en la etapa a) se trata de una micropartícula, por lo tanto, en la etapa a) se hace reaccionar una solución de micropartículas fluoro-magnéticas con anticuerpo.

- “1. Se preparó una solución 0.001% de las micropartículas magneto-fluorescentes y se funcionalizaron con el anticuerpo anti-Rotavirus...” (Ejemplo 1, Pág. 8, líneas 33 y 34).

De este modo, es claro que el capítulo descriptivo indica que la invención se trata de micropartículas.

- **Comentario Examinador:** “Los resultados de extracción y cuantificación de RNA fueron comparados con curvas patrón obtenidas a partir del RNA de vacuna Rotateq diluida y relacionan la figura 6, la cual ha sido modificada para mostrar ahora 3 grupos de datos y regresiones no lineales, mientras que en la figura 6 antigua mostraba 2 grupos de datos y una correlación lineal” y “Las modificaciones de la figura 6, RADICADO NC2016/0005568 del 13 de julio de 2018, no son aceptables porque incluye tres grupos de datos con regresiones no lineales, que no había sido considerado inicialmente, por lo cual amplían el objeto de la solicitud” (Pág. 2).

A fin de evitar inconvenientes en el trámite, se aclara que la Figura 6 modificada no ha sido incluida en el capítulo descriptivo presentado junto con este memorial. Dicha figura junto con su correspondiente descripción, son incluidas en este

memorial con el propósito de presentar datos adicionales relevantes que demuestran el nivel inventivo de la invención aquí reclamada.

- **Comentario Examinador:** “El paso d) menciona resuspender en PBS 0,15 mM contenido en BSA (pág. 7 modificado) en el paso original no se menciona el BSA (pág. 7 original)” (Pág. 2).

En la página 7, línea 34 a Página 8, línea 3, se indica: “Seguidamente, las partículas son magnetizadas y el exceso de anticuerpo es lavado dos veces usando PBS 0.15 mM pH 7.4 conteniendo 0.1% de BSA y una vez con agua destilada estéril.

Posteriormente, las partículas funcionalizadas son resuspendidas en 250 μ L de PBS 0.15 mM...”. Además, en la reivindicación original 1 se reclama “...b) Magnetizar las partículas; c) Lavar el exceso de anticuerpo con PBS con pH 7.4 conteniendo BSA; d) Resuspender las partículas funcionalizadas en PBS 0.15 mM y...”.

Por lo tanto, el experto en la técnica entiende que la etapa de “resuspensión” (etapa d)) se realiza en PBS 0.15 mM contenido en BSA.

- **Comentario Examinador:** “La página 10 desde su inicio hasta la línea 15 fue totalmente modificada” (Pág. 2).

Respetuosamente manifestamos que dicha afirmación es incorrecta, ya que las modificaciones realizadas a la Página 10 (Sección “Resultados” del Ejemplo 1) fueron las siguientes:

- Se reemplazó el término “partículas” por “micropartículas”, el cual es claramente soportado por el capítulo descriptivo como se argumentó anteriormente.
- Se reemplazó el término “autoensamblen” por “auto-ensamblen”.
- Se corrigió el error ortográfico del apellido “Pérez”.
- Se reemplazó la expresión “...mientras que en la figura 5D puede evidenciarse...” por “...mientras que en la figura 4D puede evidenciarse...” para corregir un error tipográfico, toda vez que la Figura 4 original tiene cuatro subfiguras (a, b, c y d) mientras que la Figura 5 únicamente tiene tres subfiguras (a, b y c).
- Se eliminó el párrafo “De acuerdo a los resultados, estadísticamente el modelo que más se ajusta con respecto a los datos presentados fue el de regresión lineal con una $R^2=0.89$. En el intervalo $0,8 \leq R^2 < 0,9$ se dice que existe una correlación aceptable, resaltando que este modelo se ajusta para esta patente en el intervalo de $9,5 \leq RNA \leq \infty$ ”, lo cual es válido de acuerdo con nuestra legislación.
- Se reemplazó la expresión “La Figura 8 muestra el marcado de peso...” por “La Figura 7 muestra el marcado de peso...” para corregir un error tipográfico, toda vez que la Figura 7 original es la que describe el marcador de peso

molecular, un control negativo (C-) y el control positivo (C+) correspondientes al segmento de 211 pb de la proteína de cápside VP6. Esto también se encuentra soportado por la descripción de la Figura 7 proporcionada en la Página 5, líneas 35 y 36 de la descripción original.

- **Comentario Examinador:** *“La sección de curva de calibración no incluyó una referencia a figuras mientras que la modificación hace referencia a la figura 10 (ejemplo 2)”*.

Aunque la inclusión de la referencia a la Figura 10 es claramente soportada por la descripción de dicha figura, Página 6, líneas 10 a 12 de la solicitud original, se aclara que, a fin de evitar inconvenientes en el trámite de la presente solicitud, el nuevo capítulo descriptivo presentado junto con este memorial no incluye dicha referencia en la sección de curva de calibración (Ejemplo 2).

- **Comentario Examinador:** *“En los resultados del ejemplo 2 se mencionaba una contaminación artificial, separación, concentración y detección que ahora es omitida”*.

De acuerdo con el Art. 34 de la Decisión 486/2000, “[e]l solicitante de una patente podrá pedir que se modifique la solicitud en cualquier momento del trámite”, lo cual quiere decir que el Solicitante está en su completo derecho de incluso eliminar párrafos o expresiones que considere no son necesarios para describir su invención. Dado lo anterior, la eliminación de la expresión “[l]a contaminación artificial y posterior separación, concentración y detección viral se llevó a cabo con éxito” (Pág. 14, líneas 3 y 4) es completamente válida a la luz de nuestra legislación.

- **Comentario Examinador:** *“La nueva descripción incluye nuevos análisis en la página 15 en la línea 13 sobre la figura 14 que no habían sido incluidos”*.

El párrafo en cuestión básicamente corresponde a la información descrita en la Página 15, líneas 19 a 30 del capítulo descriptivo inicialmente presentado. La diferencia entre dicha información y la información presentada en la Página 15, líneas 13 a 21 de la descripción radicada el 13 de julio de 2018, consiste en:

- Se eliminó la expresión “[e]l material genético fue amplificado y revelado en el Instituto Nacional de Salud, quienes confirmaron la presencia de los dos virus entéricos en las muestras analizadas”, lo cual es válido de acuerdo con nuestra legislación.
- Se reemplazó la expresión “Las Figuras 12 y 13 muestran las bandas correspondientes a...” por “La Figura 14 muestra las bandas correspondientes a...” para corregir un error tipográfico, toda vez que la Figura 14 original es la que describe las bandas correspondientes a un segmento de la proteína

VP6 presente en la cápside de Rotavirus y de un segmento de 192 pb correspondientes a la una región entre VP1 y 2A presentes en la cápside del VHA. Esto también se encuentra soportado por la descripción de la Figura 14 proporcionada en la Página 6, líneas 27 a 31 de la descripción original.

- Se especificó que “[e]stos hallazgos permitieron comprobar la eficiencia de la técnica a la hora de detectar partículas virales de Rotavirus y Virus de la Hepatitis A en matrices complejas” (énfasis añadido), lo cual se encuentra soportado por el mismo párrafo objetado cuando indica “en la cápside de Rotavirus y de un segmento de 192 pb correspondientes a la una región entre VP1 y 2A presentes en la cápside del VHA” y en la descripción de la Figura 14, proporcionada en la Página 6, líneas 27 a 31 de la descripción original.

Es importante establecer en este sentido que, tal como se establece en el Artículo 51, Capítulo V del Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, “El alcance de la protección conferida por la patente estará determinado por el tenor de las reivindicaciones. La descripción y los dibujos, o en su caso, el material biológico depositado, servirán para interpretarlas” (énfasis añadido), por lo que el experto en la técnica al momento de reproducir la invención no solo puede, sino que también debe recurrir a la memoria descriptiva y dibujos en su totalidad para interpretar en caso que sea necesario, la materia reivindicada.

Dado lo anterior, las modificaciones al capítulo descriptivo y reivindicatorio presentadas el 13 de julio de 2018, **no corresponden a ampliación de materia** y, por lo tanto, debieron ser aceptadas para su correspondiente análisis de patentabilidad, el cual fue solicitado mediante el pago de la correspondiente tasa. Además, como se manifestó anteriormente, dichas modificaciones se encuentran soportadas en el Art. 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el cual indica que “*el peticionario puede modificar su solicitud redactando nuevamente las reivindicaciones, aclarando determinados pasajes de la descripción del invento, o reformando aspectos de aquella que puedan dar lugar a objeciones totales o parciales por parte de la Administración, pero nunca ampliando el objeto de protección anteriormente determinado*” (Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina en Interpretación Prejudicial No. 243-IP-2013, en relación con la “*modificación de una solicitud de patente*”).

2. Reivindicaciones

En relación con las objeciones sobre la falta de claridad de las reivindicaciones, presento junto con este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de cinco (5) reivindicaciones, y que reemplaza completamente el presentado anteriormente. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

-
- 2.1 No se incluye la antigua reivindicación 6.
 - 2.2 Se corrigió el término que correspondía a un error involuntario de digitación.
 - 2.3 Se reemplazó el término “*partículas*” por “*micropartículas*”.
 - 2.4 Se modificó la antigua reivindicación 1.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad y nivel inventivo planteadas por el Examinador en su concepto técnico.

3. Pago de tasas

A pesar de que la presente solicitud aún se encuentra entre los dieciocho (18) meses para solicitar un nuevo examen de patentabilidad, según lo establecido en la Resolución 3719 de 2016, me permito manifestar que no se presenta tasa por dicho concepto.

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene menor número de reivindicaciones que el inicialmente presentado y en esencia es el mismo objeto, pero definido con mayor claridad.

4. Claridad de la solicitud

El Solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, siguiendo las recomendaciones realizadas por el Examinador en su concepto técnico.

- 4.1 Como primera medida, se informa que no se incluye la antigua reivindicación 6. De este modo, la objeción realizada a dicha reivindicación ha sido subsanada.
- 4.2 Adicionalmente, se informa que se reemplazó el término “*fluoro-inunomagnética*” correspondiente a un error involuntario e digitación, por el término correcto “*fluoro-inmunomagnética*”.
- 4.3 También se aclara que se reemplazó el término “*partículas*” por “*micropartículas*”, el cual se encuentra debidamente soportado en el capítulo descriptivo tal como se indicó anteriormente (ver ítem 1 de este memorial).
- 4.4 Además, se informa que se modificó la antigua reivindicación 1 con el propósito de.

- Especificar el término “*virus entéricos*” de acuerdo con lo divulgado en Página 7, líneas 27 a 30 de la solicitud original.
- Indicar que la etapa de lavado c) se lleva a cabo con “*PBS con 0.15 mM pH 7.4*”, según lo indicado en Página 7, línea 34 a Página 8, línea 3 de la solicitud original.
- Indicar en la etapa d) que la resuspensión de las micropartículas funcionalizadas se lleva a cabo en “*PBS con 0.15 mM conteniendo BSA*”, tal como se describe en Página 7, línea 34 a Página 8, línea 3 de la solicitud original.
- Especificar que en la etapa h) se recuperan los complejos magnetizados en PBS 0.15 mM pH 7.4.

En consecuencia, nos permitimos indicar que el presente capítulo reivindicatorio, que incluye cinco (5) reivindicaciones, se ajusta a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486/00.

5 Descripción

Por otra parte, se informa que se presenta un nuevo capítulo descriptivo, el cual ha sido modificado con el fin de aclarar la materia reclamada. Cabe mencionar que dichas modificaciones están debidamente soportadas por la memoria descriptiva inicialmente presentada, tal como se indica a continuación y, por lo tanto, no amplían la información inicialmente divulgada.

- Se reemplazó el término “*partículas*” por “*micropartículas*” a fin de unificarlo a lo largo del capítulo descriptivo. El término “*micropartículas*” se encuentra debida y claramente soportado en el capítulo descriptivo tal como se indicó anteriormente (ver ítem 1 de este memorial).
- Se corrigió el error tipográfico en la Página 2, líneas 29 y 30 para reemplazar los términos “*eletropositivas*” y “*eletronegativas*” por “*electropositivas*” y “*electronegativas*”, respectivamente.
- Se reemplazó la expresión “[*l*as partículas son funcionalizadas gracias a una cubierta rica en grupos aminos presente en su superficie, lo que facilita la adsorción del anticuerpo en posición correcta y por tanto” en la Página 4, líneas 15 a 17, por “[*l*as partículas son funcionalizadas gracias a una cubierta rica en grupos aminos presente en su superficie, lo que facilita la unión covalente del anticuerpo en posición correcta y por tanto”. Dicha modificación se encuentra soportada por la información divulgada en el apartado “*Descripción Detallada de la Invención*”, en donde se recita literalmente “***La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, consiste en funcionalizar partículas fluoro-magnéticas, las cuales poseen en su superficie “grupos aminos que permiten la unión de forma covalente a los grupos carboxilos presentes en la fracción constante (Fc)” de anticuerpos específicos para diferentes tipos de virus***

-
- entéricos*” (Página 6, línea 33 a Página 7, línea 3 de la descripción inicialmente presentada).
- Se definió el término “*virus entéricos*” en la Página 7, línea 3 de la solicitud original, de acuerdo con lo divulgado en Página 7, líneas 27 a 30 de la solicitud original.
 - Se incluyó la expresión “*anticuerpos monoclonales específicos para diferentes tipos de virus entéricos*” en la etapa a) de la técnica divulgada en la Página 7, línea 7 y 8 de la solicitud original, de acuerdo con la información descrita en la Página 13, líneas 26 a 30 de la solicitud original.
 - Se indicó que la etapa de lavado c) divulgada en la Página 7, línea 7 y 8 de la solicitud original, se lleva a cabo con “*PBS con 0.15 mM pH 7.4*”, según lo indicado en Página 7, línea 34 a Página 8, línea 3 de la solicitud original.
 - Se indicó en la etapa d) divulgada en la Página 7, línea 7 y 8 de la solicitud original, que la resuspensión de las micropartículas funcionalizadas con los anticuerpos se lleva a cabo en “*PBS con 0.15 mM conteniendo BSA*”, tal como se describe en Página 7, línea 34 a Página 8, línea 3 de la solicitud original.
 - Se indicó en la etapa i) divulgada en la Página 7, línea 7 y 8 de la solicitud original, que la caracterización microscópica del complejo (micropartícula-anticuerpo-virus) se realiza a través de microscopía confocal y/o fluorescencia y microscopía electrónica de acuerdo con lo divulgado en la descripción de la Figura 3, Página 5, líneas 12 a 15; Página 8, líneas 11 y 12; Página 9, líneas 6 a 9; Página 11, líneas 6 a 8; Página 14, líneas 31 a 34; Página 15, líneas 1 a 3 y reivindicación 4 de la solicitud original.
 - Se corrigió la unidad de la velocidad de agitación en la Página 8, línea 6 de la solicitud original.
 - Se unificó el término “*PBS 0.15 mM pH 7.4*” de acuerdo con la información divulgada en la solicitud original.
 - Se reemplazó el término “*absorción*” en la Página 9, línea 34, Página 12, líneas 20 y 26 y Página 14, líneas 16 y 26 de la solicitud original por “*adsorción*”. Dicha modificación se encuentra soportada en la Página 4, líneas 15 a 18 de la solicitud original, en donde se divulga “*Las partículas son funcionalizadas gracias a una cubierta rica en grupos aminos presente en su superficie, lo que facilita la adsorción del anticuerpo en posición correcta y por tanto, la detección sensible y selectiva de diferentes tipos de virus entéricos con implicaciones a nivel de salud pública*”.
 - Se reemplazó la expresión “*...mientras que en la figura 5D puede evidenciarse...*” en la Página 11, líneas 1 y 2 de la solicitud original, por “*...mientras que en la figura 4D puede evidenciarse...*” para corregir un error tipográfico, toda vez que la Figura 4 original tiene cuatro subfiguras (a, b, c y d) mientras que la Figura 5 únicamente tiene tres subfiguras (a, b y c).
 - Se reemplazó la expresión “*La Figura 8 muestra el marcador de peso...*” por “*La Figura 7 muestra el marcador de peso...*” en la Página 11, línea 33 de la solicitud

-
- original, para corregir un error tipográfico, toda vez que la Figura 7 original es la que describe el marcador de peso molecular, un control negativo (C-) y el control positivo (C+) correspondientes al segmento de 211 pb de la proteína de cápside VP6. Esto también se encuentra soportado por la descripción de la Figura 7 proporcionada en la Página 5, líneas 35 y 36 de la descripción original.
- Se reemplazó la expresión “*Las Figuras 12 y 13 muestran las bandas correspondientes a...*” en la Página 15, línea 21 de la solicitud original, por “*La Figura 14 muestra las bandas correspondientes a...*” para corregir un error tipográfico, toda vez que la Figura 14 original es la que describe las bandas correspondientes a un segmento de la proteína VP6 presente en la cápside de Rotavirus y de un segmento de 192 pb correspondiente a una región entre VP1 y 2A presentes en la cápside del VHA. Esto también se encuentra soportado por la descripción de la Figura 14 proporcionada en la Página 6, líneas 27 a 31 de la descripción original.
 - Se especificó al final de la descripción una nota para destacar que “*que todos los resultados obtenidos fueron validados por el grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS) quienes son referentes de este tipo de análisis en agua en el país*”.
 - Se eliminaron algunos párrafos y/o expresiones, lo cual es válido de acuerdo con nuestra legislación.
 - Se corrigieron algunos errores de ortografía y tipografía.

Por otra parte, se informa que se presenta un nuevo resumen con el propósito de dar mayor claridad a la materia que se reclama en el capítulo descriptivo.

6 Nivel Inventivo

El Examinador establece en su concepto técnico la falta de nivel inventivo de las reivindicaciones 1 a 6 a la luz de los documentos CN103805574 (D1) y US20120231971 (D2).

En este sentido, me permito decir que el artículo 18 de la Decisión 486 establece que “*Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica*”.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Considerando la anterior definición y teniendo en cuenta las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, es deseo del Solicitante presentar argumentos que demuestran el nivel inventivo de la presente solicitud. Es así como el Solicitante reitera que:

En la siguiente tabla se resaltan las principales diferencias que apartan a la presente invención del estado de la técnica citado en el oficio que se contesta:

Características de la Presente Solicitud	D1	D2
La presente invención relaciona una técnica fluoro-inmunomagnética para detectar virus entéricos en aguas crudas y potables	Relaciona una técnica para recuperar el virus de la Hepatitis A a partir de cuerpos de agua	Relaciona métodos y equipos empleados en la detección de analitos
En la presente invención se hace uso de micropartículas amino-fluoro-magnéticas de 0.5-2.9 μm las cuales son funcionalizadas con anticuerpos monoclonales específicos para diferentes tipos de virus entéricos (ej. Rotavirus y Hepatitis A). La presencia de grupos aminos en la superficie de las micropartículas confiere una ventaja competitiva con respecto a D1 ya que no requiere de procesos de activación química de grupos funcionales. Por el contrario, los grupos aminos facilitan la unión covalente del anticuerpo a través de los grupos carboxi-terminal presentes en la fracción constante (Fc) del anticuerpo. Este proceso permite que se lleve a cabo la	En esta patente se realiza una reacción entre una solución de anticuerpo anti-Hepatitis A con una solución de micropartículas super-paramagnéticas con diámetro de 3 μm , a las cuales previamente se les debe activar sus grupos carboxílicos químicamente empleando carbodi-imida y N-hidroxisuccinimida. Aquí se puede apreciar claramente, que en este sentido la técnica requiere una etapa adicional de activación de grupos funcionales. Una de las desventajas de emplear los grupos carboxílicos como grupo de unión a los anticuerpos, es que estos se unen a los grupos aminos distribuidos en	En esta patente se reporta un método y un dispositivo para la detección de analitos, los cuales son un complejo formado mediante el acople del analito y un receptor mediante técnicas de microfiltrado y adsorción del complejo en filtros de intercambio iónico mediante el uso del punto isoeléctrico o la diferencia de cargas entre los complejos receptor-analito y los receptores libres. La técnica emplea dos elementos de reconocimiento, uno de los cuales se inmoviliza sobre el chip y otro que se encuentra acoplada a una nanopartícula magnética y

inmovilización de las glicoproteínas en la posición correcta; es decir, con la región Fab disponible para la unión de dos antígenos por cada anticuerpo. Este aspecto, redundante en la alta sensibilidad obtenida empleando esta técnica. Comparando este mismo aspecto con la técnica de D2, el proceso de inmovilización empleado en esta invención es mucho más sencillo y no requiere de equipos sofisticados ni reactivos, a diferencia de los relacionados que empleó filtros de intercambio iónico.	toda la estructura proteica característica de los anticuerpos. Esto hace que su orientación no siempre sea la adecuada y por tanto se reduzcan las posibilidades de unión al antígeno, disminuyendo en este sentido la sensibilidad de la técnica.	fluorescente. Por tanto, en esta técnica se requieren de dos elementos de reconocimiento destinados a la detección del mismo analito además de recipientes provistos de filtros especiales para poder hacer los procesos de inmovilización y separación de los receptores libres y los receptores acoplados a las nanopartículas.
Las micropartículas fluoromagnéticas se dejan reaccionar con una solución de anticuerpos monoclonales a 37°C/2 horas. En el caso del anticuerpo anti-Hepatitis A reconoce el epítotope VP1 mientras que el anticuerpo anti-Rotavirus reconoce el epítotope VP6 en la cápside viral de rotavirus del “grupo A”.	La incubación de las micropartículas activadas con el anticuerpo monoclonal que reconoce el epítotope VP2 del virus de la Hepatitis A por 2 h a 37°C.	No se encontraron reportes de tiempos y temperaturas empleadas. Tampoco se especifica la región de unión de los anticuerpos empleados. Sólo se menciona que son monoclonales.
Las micropartículas fluoromagnéticas funcionalizadas con los anticuerpos monoclonales son expuestas a 1 litro de agua (cruda y/o potable) con posible contenido viral y se dejan reaccionar durante un período entre 1 a 3 horas a	Las partículas inmunomagnéticas son expuestas a diferentes concentraciones del virus de la Hepatitis obtenido a partir de la “vacuna contra la Hepatitis A atenuada”, disponible en China.	No se muestran ensayos o resultados de la exposición del chip sensor a virus. Se presenta una gráfica con <i>E.coli</i>, la cual es 1000 veces más grande que los virus entéricos y que por supuesto genera

temperatura ambiente con agitación constante entre 120 y 150 rpm.		variaciones en las respuestas que se puedan obtener en el proceso de sensado.
Los complejos micropartícula-anticuerpo-virus fueron separados aplicando un campo magnético externo.	Los complejos micropartícula-anticuerpo-virus fueron separados aplicando un campo magnético.	Los complejos de nanopartículas magneto-fluorescente-anticuerpo-analito y receptor libre fueron separados a través de un campo magnético o electromagnético que puede emplear un campo magnético o un pulso eléctrico para realizar la separación de las nanopartículas fluoro-magnéticas acopladas a los anticuerpos.
La caracterización de los complejos micropartículas-anticuerpos-virus empleó métodos de microscopía y de biología molecular. Inicialmente, la propiedad de fluorescencia de las micropartículas fue usada para observar la formación de clústers o agrupaciones, producto de la presencia de virus que inducen autoensamblaje de las micropartículas*.	Debido a que las partículas empleadas en esta patente tenían solo propiedad magnética no se hizo ningún proceso de visualización o caracterización microscópica.	Los complejos fueron caracterizados mediante la medición de emisión de intensidad de la fluorescencia producida por las nanopartículas
Aquellas muestras que exhibieron la formación de agregados, se les realizó un choque térmico para des-absorber los virus unidos y de esta forma confirmar a	El producto de la separación magnética fue usado para realizar extracción de RNA usando el método de Trizol el cual emplea	No se realizan procesos de extracción de material genético

través de métodos molecular la presencia de los virus. La extracción de RNA se hizo empleando el Kit QIAMP de Qiagen para hacer la extracción de RNA.	varios pasos y reactivos para finalmente obtener el RNA viral disuelto en agua libre de RNA.	
El RNA extraído fue amplificado realizando RT-PCR dada la naturaleza del genoma de los virus empleados, permitiendo la confirmación de los resultados presuntivos obtenidos mediante microscopía confocal.	El RNA es extraído y cuantificado usando PCR cuantitativa fluorescente usando SYBR Green.	No se realizan procesos de caracterización molecular.
La presente invención muestra la utilidad de la técnica fluoro-inmuno-magnética para detección de virus entéricos en aguas crudas y potables procedentes de ríos y de la fase de captación de 4 plantas de tratamiento de aguas, demostrando que es escalable, reproducible, sensible y que no se ve afectada por la presencia de interferentes normalmente presentes en este tipo de muestras.	La patente no presenta resultados de la técnica en muestras reales. La información contenida sólo muestra ensayos en laboratorio, bajo condiciones contraladas, con concentraciones e inoculaciones artificiales del virus obtenido a partir de una vacuna atenuada. Aunque los autores reportan que elimina inhibidores de PCR no se ve reflejado en la descripción ya que no se presentan ensayos en la matriz real, en este caso, agua potable o cruda.	El sensor presentado no muestra ensayos reales que permitan valorar como sería su desempeño en muestras reales, con matrices complejas tales como aguas crudas y/o potables. Tampoco se presentan resultados con partículas virales, ya que los ejemplos gráficos contenidos en la patente se refiere siempre los ejemplos gráficos más enfocados a bacterias, la cuales son 1000 veces más grandes que los virus entéricos, lo cual influye directamente sobre la señal de fluorescencia que pudieran emitir las nanopartículas.

Adicionalmente a los argumentos presentados en la tabla anterior y teniendo en cuenta los comentarios realizados por el Examinador en el ítem 8 del oficio que se contesta (Sección: “*Respuesta a los argumentos del señor solicitante*”, Páginas 7 a 10), a continuación, se presentan argumentos adicionales que refuerzan las afirmaciones realizadas por el Solicitante:

- a. El Examinador ha indicado “*[e]s oportuno aclarar que el solicitante no menciona en la descripción (...) partículas que tienen 0,5-2,9 μm por lo que este Despacho no tiene en cuenta estas características al considerarse no sustentadas*” (Página 7 de la AO No. 12429)

En la presente invención se hace uso de micropartículas amino-fluoro-magnéticas de 0,5-2,9 μm . En la memoria descriptiva, en la Figura 4A se presenta el tamaño de la micropartícula sin funcionalizar. La Figura 1b a continuación, presenta un zoom para que se pueda apreciar el dato del diámetro de la más pequeña trabajada.

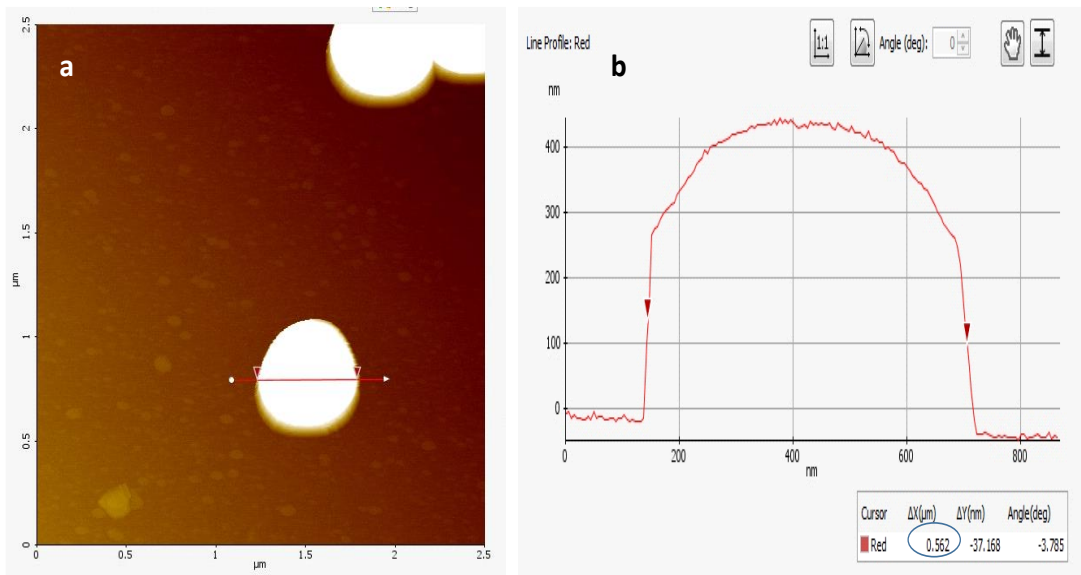


Figura 1. a) Microscopía de fuerza atómica de una micropartícula fluoro-magnética b) Diámetro de la misma en micras.

- b. El Examinador ha indicado “*[e]l solicitante menciona un proceso de absorción no covalente de los anticuerpos mediados por grupos funcionales -COOH de la región Fc y los grupos -NH₂ de las partículas. Es oportuno aclarar que de acuerdo al paso a) en la descripción se habla de hacer reaccionar una solución de partículas fluoro-magnéticas con un anticuerpo (pág. 7) se trata de hacer reaccionar los grupos -COOH del anticuerpo con los grupos -NH₂ de las partículas formando un enlace covalente contrario a lo mencionado por el solicitante. Por otra parte, si fuese el caso de interacciones no covalentes entre los grupos funcionales de la partícula y en anticuerpo, estas ocurrirían en la superficie y por tanto se trataría de un fenómeno de adsorción. Adicionalmente*

el documento D1 enseña que los métodos de separación inmunomagnéticos usan microesferas que se unen covalentemente a ligandos a través de grupos funcionales carboxy, amino, hidroxilo, aldehído entre otros” (Página 8 de la AO No. 12429)

Los autores asumen errores de transcripción que llevaron a la interpretación errónea por parte del Examinador. En la memoria descriptiva, apartado “*Descripción Detallada de la Invención*” se recita literalmente “**La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, consiste en funcionalizar partículas fluoro-magnéticas, las cuales poseen en su superficie “grupos aminos que permiten la unión de forma covalente a los grupos carboxilos presentes en la fracción constante (Fc)” de anticuerpos específicos para diferentes tipos de virus entéricos**” (Página 6, línea 33 a Página 7, línea 3 de la descripción inicialmente presentada).

En efecto, los grupos aminos facilitan **la unión covalente del anticuerpo** a través de los grupos carboxi-terminal presentes en la fracción constante (Fc) de la biomolécula, permitiendo obtener una orientación adecuada durante el proceso de inmovilización sobre la micropartícula como se muestra en la Figura 2 presentada a continuación.

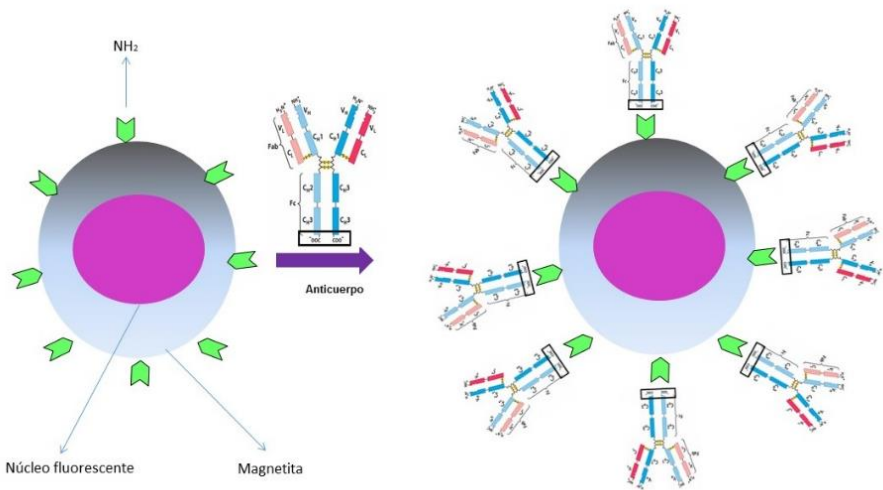


Figura 2. Representación esquemática del proceso de inmovilización de anticuerpos contra diferentes virus entéricos sobre micropartículas fluoro-magnéticas modificadas con grupos aminos en su superficie.

Las micropartículas funcionalizadas con los anticuerpos fueron analizadas a través de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y se realizaron medidas del diámetro de las mismas antes y después del proceso. A través de esta técnica se determinó un diámetro inicial de las micropartículas de 562 nm (Figura 3A presentada a continuación), lo cual corresponde con la ficha técnica del producto. Una vez las micropartículas fueron funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus, su diámetro aumentó

aproximadamente en 10-12 nm (Figura 3B presentada a continuación). La altura de una IgG es de 12 nm en posición vertical, esto significa, con la región Fab apuntando al analito. No obstante, debido al proceso de inmovilización sobre los grupos aminos presentes en las micropartículas fluoro-magnéticas, se puede presentar rotación de la biomolécula permitiendo movimientos rotacionales (Tronin, A. *et al.*, 1995) que generan variaciones en los valores (i.e. desde 10 nm a 12 nm) (Villamizar R, 2009). Esta información se encuentra divulgada en la memoria descriptiva inicialmente presentada, Figuras 4A y 4B, apartado de “*Resultados*” (Página 10, líneas 25 a 33 de la descripción inicialmente presentada).

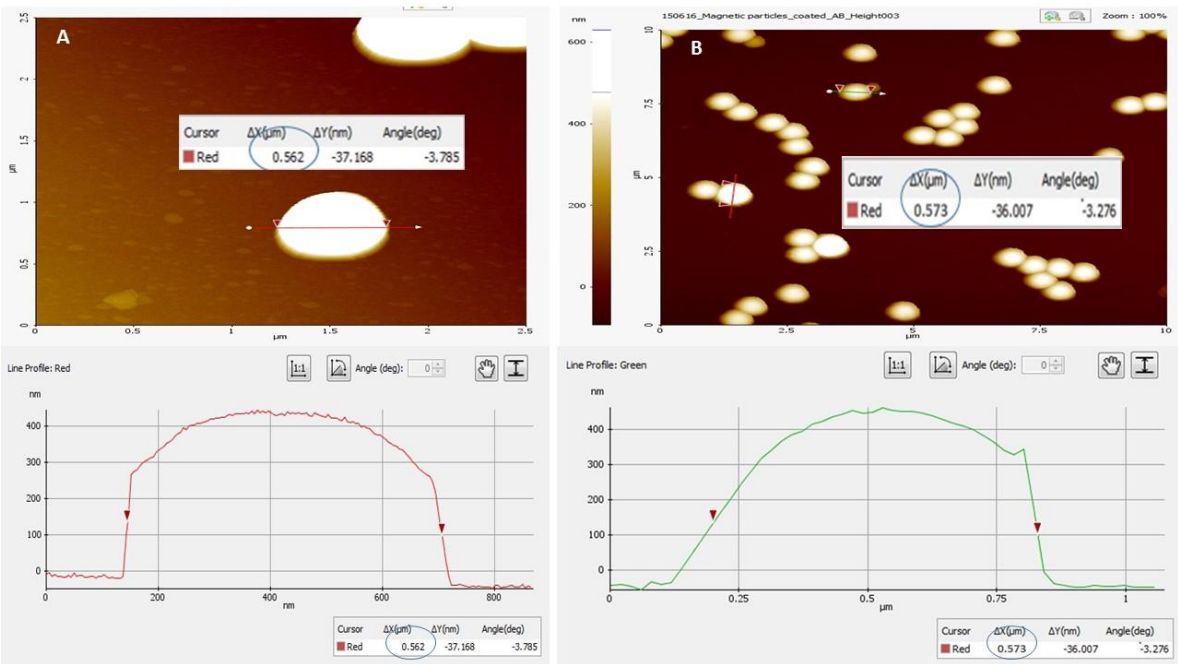


Figura 3. Imágenes de Microscopía Atómica de A) Micropartículas fluoro-magnéticas B) Micropartícula fluoro-magnética funcionalizada con anticuerpo anti-Rotavirus

La reacción de activación química mediante el uso de carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) reportada en D1 da lugar a compuestos intermediarios que reaccionan con grupos aminos del anticuerpo estableciendo la unión covalente. Este método representa más costos comparado con el empleado en la presente invención, debido al uso adicional de reactivos. Además, requiere tiempo adicional en el experimental y varios artículos han reportado que durante la reacción se generan compuestos intermedios derivados de la urea que en ocasiones puede conllevar a la denaturación de la proteína. Finalmente, una gran diferencia de este método con respecto a la expuesta en la presente invención, es que **no permite controlar la orientación de los anticuerpos**, puesto que los grupos funcionales para establecer el enlace (grupos amino) se repiten a lo largo de la estructura de la proteica por lo que la orientación de la biomolécula es random o desordenada (Figura 4 presentada a continuación).

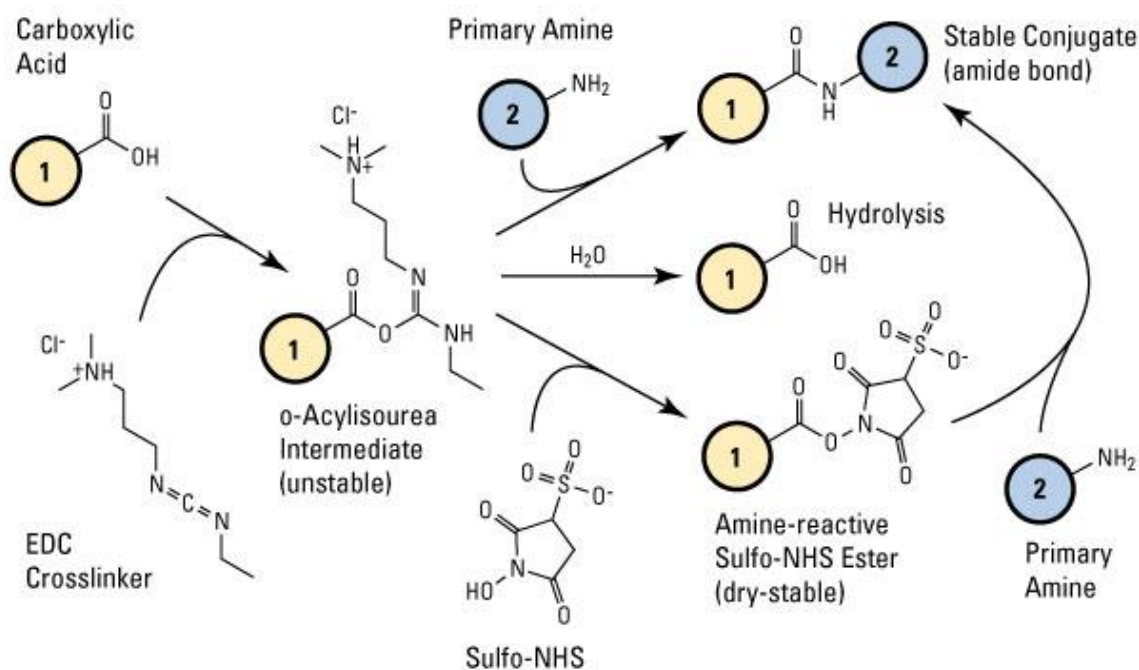


Figura 4. Representación esquemática de los procesos de inmovilización de anticuerpos empleados en D1 mostrando el nivel de complejidad en el mismo.

Con respecto a D2, los autores presentan el uso de **DOS anticuerpos**, uno de los cuales se inmoviliza directamente sobre la superficie de un chip sensor, mientras que el otro anticuerpo, manifiestan los autores se encuentra acoplado directamente a una **nanopartícula magnética y fluorescente**. No obstante, no se describen los métodos físicos o químicos empleados en su inmovilización y, por tanto, la orientación del anticuerpo es desconocida. En cualquier caso, el empleo de dos anticuerpos para detectar un mismo analito incrementa los costos y la complejidad de los ensayos en comparación con lo descrito en la presente invención (Figura 5 presentada a continuación).

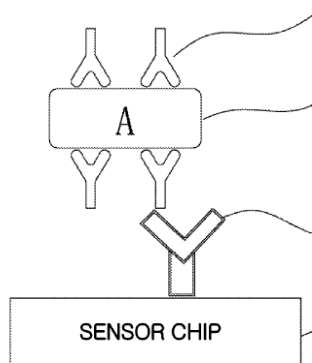


Figura 5. Representación esquemática tomada de la patente US 2012/0231971 A1

(D2) en la que los patógenos se encuentran unidos a anticuerpos primarios y posteriormente estos son expuestos a un chip sensor el cual tiene inmovilizado sobre su superficie un anticuerpo secundario que detecta el complejo primario

Referencias:

Franco E.J., Hofstetter H and Hofstetter O. **2006**. A comparative evaluation of random and site-specific immobilization techniques for the preparation of antibody-based chiral stationary phases. J. Sep. Sci. 29: 1458-1469

Tronin, A., Dubrovsky, T., Nicolini, C. Langmuir. **1995**. 11, 385–389.

Villamizar R. Biosensors based on carbon nanotube field effect transistors for detecting pathogenic microorganisms. En: España **2009**. ed: Universitat Rovira i Virgili ISBN: 978-84-692-9761-2/DL v. 0 págs. 220. Disponible en: <https://tdx.cat/handle/10803/9037>

- c. El Examinador indica “que, de acuerdo a la descripción detallada de la invención (pág. 7 líneas 12 a 14, pág. 8 líneas 3 a 9, pág. 9 línea 7), no se especifica hacia que epítope está dirigido el anticuerpo que se enlaza a la partícula. Las menciones sobre las regiones VP1 y VP6 son el resultado de la amplificación RT-PCR y análisis electroforético en geles de agarosa del material genético recuperado por el método. Por lo anterior, no se divulga un anticuerpo específico dirigido contra los epítopes mencionados. El documento D1 enseña que los anticuerpos con los que se funcionalizan las partículas son anti-VP2 monoclonal murino” (Página 8 de la AO No. 12429).

En la memoria no se describieron casas comerciales ni se dieron detalles de los productos empleados. Se adjunta ficha técnica de los productos comprados que indican la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-Rotavirus contra proteína de cápside VP6 y anti-Hepatitis A contra proteína de cápside VP1.

Datasheet for ABIN2150728
anti-Rotavirus VP6 antibody

Overview	
Antigen:	Rotavirus VP6
Reactivity:	Rotavirus
Host:	Mouse
Clonality:	Monoclonal
Application:	ELISA

Datasheet for ABIN865930
anti-HAV VP1 antibody

Overview	
Antigen:	HAV VP1
Reactivity:	Hepatitis A Virus (HAV)
Host:	Mouse
Application:	ELISA, Western Blotting (WB)

- d. El Examinador ha indicado “D1 es el estado de la técnica más cercano al método y que el elemento diferenciador de la solicitud es el uso de partículas fluoro-magnéticas que permiten hacer una detección por métodos

relacionados con la fluorescencia. El método mencionado en D1 está orientado al enriquecimiento y detección del virus de hepatitis A en cuerpos de agua usando partículas inmunomagnéticas y a pesar de que los ejemplos muestran ensayos de enriquecimiento en muestras preparadas, el método es aplicable a cualquier cuerpo de agua, se le recuerda al solicitante que los ejemplos no representan limitaciones del documento D1. El documento D1 enseña que la detección se realiza por métodos muy conocidos de la biología molecular tales como extracción de ARN, formación de ADNc y PCR en tiempo real (reivindicación 1)” (...) “Respecto al documento D2 este está orientado a partículas fluoro-magnéticas en las cuales se encuentran inmovilizados receptores que pueden ser anticuerpos que permiten detectar analitos tales como virus por medición de la fluorescencia emitida (párr. [0002], [0020], [0024] y [0099])” (Página 9 de la AO 12429).

Se desea agradecer al Examinador sus comentarios, los cuales permitieron detectar algunos errores involuntarios y se espera que a través de los argumentos aquí plasmados haya suficiente claridad de que la presente invención difiere en varios aspectos de D1 y D2. Algunos de ellos son:

1. De la presente invención se resalta la sencillez del procedimiento. Las micropartículas empleadas en este ensayo **no requieren** de pasos preliminares de activación de grupos químicos para realizar la inmovilización de los anticuerpos, contrario a lo plasmado en **D1**.
2. La utilización de **micropartículas fluoro-magnéticas**, ya que **D1 sólo emplea partículas magnéticas** con lo cual carece de la propiedad de fluorescencia y **D2 emplea nanopartículas fluoro-magnéticas**, por lo cual el rango de tamaño en la escala nanométrica hace que varíen las condiciones experimentales de detección del analito requiriendo el empleo de un chip sensor funcionalizado con anticuerpos para poder emitir señales en presencia del patógeno.
3. El tamaño de las micropartículas empleadas en esta invención permite realizar observación y seguimiento en la formación de clústers o agregados a través de técnicas sencillas de microscopía confocal o de fluorescencia, lo que se convierte en una ventaja de cara a la aplicación en un laboratorio de análisis rutinario de virus. **Esto difiere de lo presentado en D1**, donde las partículas sólo exhiben comportamiento magnético lo cual no posibilita que se haga este tipo de seguimiento. **También difiere de D2**, donde la medición de emisión de

fluorescencia de las nanopartículas está ligado al uso de un chip sensor, requiriendo equipos sofisticados debido a su pequeño tamaño, así como de personal capacitado para la respectiva interpretación de resultados.

Además, es de resaltar que la utilización de micropartículas fluoro-magnéticas expuesta en esta invención sí ofrece un valor añadido, ya que permitió hacer seguimiento a los eventos de captura viral. La formación de agregados o clúster después de que los complejos (micropartícula-anticuerpo) fueron expuestos a las muestras de agua con potencial contenido viral, permitieron determinar la presencia de forma indirecta de los patógenos. Estas agrupaciones fueron analizadas adicionalmente con herramientas informáticas especializadas (Figura 6 presentada a continuación). Se procesaron varias muestras procesadas con un área de 900 μm^2 cada una y se obtuvieron resultados comparables. Cuando las micropartículas se expusieron a los virus (Figura 6-barra gris) cerca del 92% de ellas formaron clústers, mostrando cerca de un 64% de probabilidades de formar agrupaciones de más de 40 micropartículas y cerca de un 28% de formar agrupaciones de menos de 20 micropartículas. En contraste, las micropartículas sin funcionalizar y sin exponer a los virus, en un 40% formaron agrupaciones de sólo 2 a 4 micropartículas (Figura 6-barra negra), al igual que las funcionalizadas sólo con el anticuerpo, pero sin ser expuestas a los virus en un 65% formaron agrupaciones de 2 a 4 micropartículas de forma similar a las micropartículas iniciales sin ningún tratamiento (Figure 6, barra en tramas). Lo anterior indica, que la propiedad de fluorescencia de las micropartículas da un valor añadido a la presente invención que no reporta D1 y mucho más sencilla de la reportada por D2.

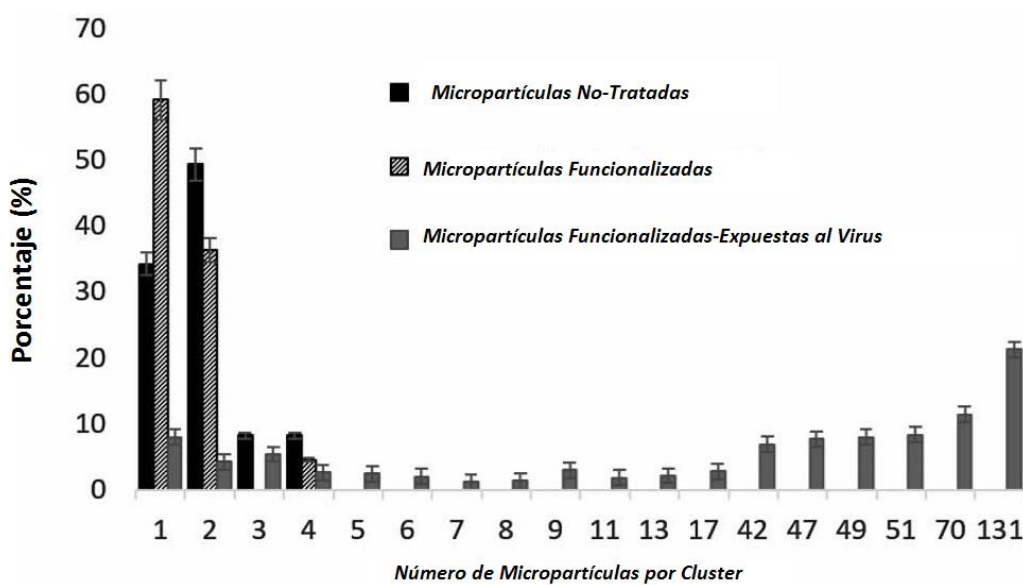


Figura 6. Frecuencia de distribución de tamaños de clústers de las micropartículas sin tratar (barra negra), funcionalizadas con el anticuerpo (barra en tramas) y después de haber sido expuestas a los virus (barra gris).

-
4. El método de inmovilización de los anticuerpos empleado en la presente invención es mucho más sencillo y efectivo en términos de orientación de las biomoléculas en comparación con, **D1 que es azarosa. D2 no reporta el procedimiento, por lo cual la orientación del anticuerpo no está definida.**
 5. **D1 ni D2** provee datos experimentales de ensayos conducidos en muestras reales, todos los ensayos fueron realizados en agua destilada estéril contaminada artificialmente con concentraciones conocidas del patógenos previamente certificado, lo cual convierte a **D1 y D2** en un *proof-of-concept* que no muestra alcances reales ni escalables, dado una matriz compleja como lo es el agua, afectaría sin duda el “*performance*” de las dos técnicas aquí planteadas. **Aunque el Examinador considera que esto no es una limitante para D1 y D2,** lo cual no objetamos, si **resaltamos que la presente invención ha sido probada en muestras reales de agua cruda y potable obtenida directamente de plantas de tratamiento de la región, lo cual sin duda representa un “valor diferencial” a la presente, por el hecho de demostrar que la técnica es capaz de detectar los patógenos aún en presencia de interferentes de diferente naturaleza contenidos en las matrices analizadas. Además, los resultados fueron validados por el laboratorio referente en el país para este tipo de análisis (Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud INS)** lo que le da un valor “**añadido**” con respecto a lo presentado por D1 y D2.

La técnica se ha seguido ensayando y mejorando, es por eso que, en respuesta al primer examen de fondo, se presentaron los resultados obtenidos del proceso de separación inmunomagnético de Rotavirus en diferentes tipos de aguas (i.e. destilada, potable y cruda). Esto con el fin de demostrar la eficacia de la misma, porque los autores pretenden dar de alguna forma solución a la problemática actual existente para análisis de virus en muestras de aguas. Se presenta la respectiva gráfica corregida, la cual soporta el evento de detección viral en muestras reales. **Este aspecto, contrario a querer generar ampliación en el objeto de la misma, lo que busca es dar mayor robustez a los ensayos iniciales presentados en la memoria descriptiva** (Figura 7 presentada a continuación).

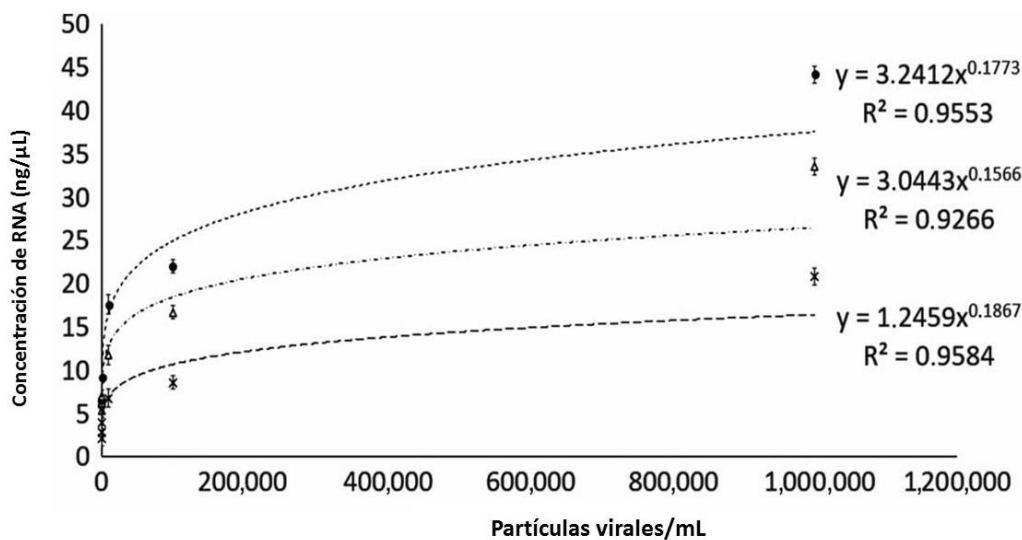


Figura 7. Muestra el RNA extraído a partir de la vacuna Rotateq (●), agua destilada contaminada artificialmente con Rotateq (▲) y agua potable contaminada artificialmente con Rotateq (x) concentrados y separados a través de la técnica de separación fluoro-inmuno-magnética.

- Otro aspecto para resaltar de la presente invención con respecto a D1 y D2, es que esta invención está dirigida a **virus entéricos y cualquier patógeno diluido en agua y se muestran resultados sobre la detección de Rotavirus y el Virus de la Hepatitis A**, dos de los virus entéricos más frecuentemente encontrados en aguas crudas y potables en Colombia. Por su parte, **D1 sólo refiere su aplicación a la detección del Virus de la Hepatitis A** y **D2, aunque dice que su aplicación está dirigida a analitos en general** sólo se muestra un uso con la bacteria **E.coli**.

En este sentido, una persona medianamente versada en la materia técnica no encontraría motivación alguna para combinar las enseñanzas de **D1** con **D2**, toda vez que por un lado D1 muestra partículas magnéticas sin fluorescencia que son de tipo carboxílico y D2 enseña la utilización de nanopartículas fluorescentes inmovilizadas con un chip y el empleo de dos anticuerpos para la detección de un mismo analito, lo cual redundaría en costos y mayor complejidad. Por lo tanto, se podría decir que **no existe** ninguna forma evidente de combinar las enseñanzas de estas anterioridades, ya que no genera ventajas competitivas de cara a una aplicación real en un laboratorio convencional de análisis rutinario de virus en muestras de agua.

Además, el Solicitante respetuosamente manifiesta que el Examinador está llevando a cabo un análisis retrospectivo, en donde el Examinador trata de reconstruir el proceso de la invención a partir de las enseñanzas de dos documentos que **no enseñan o sugieren** el uso de micropartículas inmunofluorescentes con grupos amino activos para la detección de virus entéricos en agua.

Como bien lo sabe este Despacho, este tipo de análisis carece de toda validez, tal y como lo propone este mismo Despacho en su Instructivo de Exámenes de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad, de la siguiente manera:

“Análisis ex post facto o retrospectivo o hindsight

Es importante tener en cuenta que una invención reivindicada que, a primera vista, parece evidente, puede ser inventiva. Una vez formulada una nueva idea, a menudo se puede demostrar teóricamente el modo en el que se podría llegar a ella, a partir de algo conocido, a través de una serie de etapas aparentemente fáciles. El Examinador de patentes debe evitar el uso de un análisis ex post facto de este tipo.

Es decir, el estado de la técnica se debe examinar sin el beneficio del conocimiento ofrecido retrospectivamente por la invención reivindicada. La indicación o la sugerencia que permita llegar a la invención reivindicada deben proceder del estado de la técnica o de los conocimientos generales de la persona del oficio normalmente versada en la materia, y no basarse en la divulgación del solicitante”. (el subrayado es nuestro).

De esta forma, teniendo en cuenta que los documentos D1 y D2 no mencionan, enseñan o sugieren, en forma individual o en combinación, todas las características técnicas reclamadas por el Solicitante, no es posible afirmar que la invención hubiera podido haber sido derivada en forma obvia a partir de dichos documentos.

Considerando lo anterior, es claro que las nuevas reivindicaciones 1 a 5 cumplen con el requisito de nivel inventivo, tal como se define en el artículo 18 de la Decisión 486 y como se explica detalladamente en el Manual Andino y la Guía para Examinadores de la Superintendencia de Industria y Comercio.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor Examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al Examinador para emitir los exámenes de fondo- y 42 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo que señala que: *“habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión, que será motivada. La decisión resolverá todas las peticiones que hayan sido oportunamente planteadas dentro de la actuación por el peticionario y por los terceros reconocidos”*, (el subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

Señor Director,



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

ANEXOS

- Nueva memoria descriptiva que incluye:
 - Nuevo capítulo descriptivo.
 - Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por cinco (5) reivindicaciones.
 - Nuevo resumen.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

ESTADO DE LA TÉCNICA

Se considera que más de 140 tipos de virus entéricos pueden ser encontrados en fuentes hídricas (Peláez D, *et al*, 2010). Entre estos se encuentran los Rotavirus, Norovirus, Sapovirus, Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus, Reovirus (Kiulia, N. *et al*, 2015). Una investigación publicada en 2016, por el grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, sobre aguas procedentes de 102 municipios de Colombia, mostró que el 50,7% de las muestras fue positivo para algún tipo de virus entérico. La mayor prevalencia fue de virus Hepatitis A con un 26,73%, seguido de Enterovirus y Rotavirus con 20,48 % respectivamente y adenovirus (18,05%). Además, los autores reportaron que los niveles de virus en aguas crudas y potables fue muy similar (48,26% y 45,83%, respectivamente) (Peláez D. *et al*, 2016).

Una fuente hídrica contaminada con virus entéricos es de suma importancia a nivel de salud pública, ya que muchos de ellos pueden permanecer viables en las fuentes de agua, teniendo la capacidad de pasar las barreras físicas y químicas (cloro) de

los procesos convencionales de potabilización, llegando incluso a cultivos que pueden convertirse en vectores de transmisión de enfermedades.

Por tal motivo, microbiólogos, epidemiólogos y responsables de la calidad de agua, han debatido sobre la utilidad de hacer seguimiento y monitoreo a la presencia de virus como indicadores de contaminación, comprobando así la eficiencia de los procesos de potabilización. Actualmente en Colombia no existe ninguna regulación sobre virus en muestras de aguas.

Desde el punto de vista analítico, los virus son difíciles de detectar debido a que se encuentran diluidos en agua (1 a 10^3 partículas virales/Lt de agua) (Kiulia, N., y otros, 2015). Los métodos de detección de virus en muestras como el agua, están basados en métodos moleculares. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR acoplada a reverso transcriptasa (RT-PCR) y la PCR cuantitativa y en tiempo real (qPCR), son algunas de las más utilizadas y exhiben alta sensibilidad y especificidad. No obstante, existen limitantes tales como la ausencia de correlación entre el genoma viral detectado y su nivel de infectividad, haciendo necesario emplear métodos adicionales como el cultivo celular para poder identificarlos.

El cultivo celular aunque sensible también es laborioso y costoso. Además, no todos los virus son capaces de generar efecto citopático con lo cual el proceso de detección se dificulta. Incluso para algunos enterovirus como es el caso de Norovirus, no hay disponibles líneas celulares de propagación (Hamzaa IA et al, 2011).

El uso de métodos serológicos también es muy frecuente. Una de ellas es el ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA). No obstante, una de las dificultades que presenta es que detectan títulos virales elevados, requiriendo pretratamientos para concentrar los virus (Kiulia, N. et al. 2015).

Para concentrar los virus, se emplean técnicas tales como la adsorción-elución. Esta técnica se fundamenta en el uso de membranas electropositivas o electronegativas que permiten la adsorción de las partículas virales debido a las interacciones electrostáticas entre ambos. Seguidamente, son eluidos de la superficie del filtro a través de soluciones como extracto de carne, glicina o hidróxido de aluminio, que son sustancias que compiten por los sitios de unión del virus en la

membrana, liberándolos a la solución (Calgua, B et al. 2013). La principal desventaja del método es la baja recuperación viral, ya que en un estudio reportado por Fumian, T., et al, el método basado en adsorción-elución tuvo una tasa de recuperación de tan sólo el 3.5% (Fumian, T., et al, 2010).

5

Otra técnica empleada para la concentración viral es la ultrafiltración tangencial (UFT), la cual consiste en realizar una serie de filtrados en membranas de distinto tamaño de poro, dirigiendo la muestra a un filtro de flujo tangencial por medio de una bomba peristáltica de alta presión, produciendo dos fracciones: la filtrada de interés y la excluida por el filtro (Negrete, A. et al, 2014). En un estudio realizado por Alavandi et al, tras procesar 100 L de agua a través de esta técnica, se obtuvo un volumen final de 100 mL y un rango de recuperación viral que osciló entre un 7.5 a 89.61% (Alavandi et al, 2015). La técnica tiene varias limitantes. Una de ellas, es el tiempo. Se requieren 24 a 48 horas para realizar la concentración viral (Peláez, D. et al. 2010). Su aplicación también se ve limitada debido a la concentración simultánea de interferentes orgánicos e inorgánicos presentes en las muestras que no permiten que los procesos de identificación viral posteriores tales como PCR o cultivos celulares, se lleven a cabo adecuadamente, generando falsos negativos.

Con el fin de evitar estos inconvenientes, se han introducido otras técnicas de concentración. Entre estas cabe resaltar la separación inmunomagnética (IMS). El prefijo “**inmuno**” involucra el uso de anticuerpos (Ac), que son glicoproteínas en forma de “Y” las cuales son generadas por el sistema inmune de animales y humanos en presencia de una sustancia extraña o antígeno (Ag). Los Ac presentan afinidad intrínseca por el Ag que puede alcanzar hasta 10^{11} mol/L, donde el antígeno es reconocido a través de la interacción antígeno-anticuerpo (Ac-Ag) (Mortaza, I. 2013).

El sufijo “**magnética**” indica el uso de una partícula que presenta esta propiedad, cuya superficie es usada para inmovilizar anticuerpos (Ac) a través de diferentes métodos. La inmovilización debe asegurar que el Ac reconozca el antígeno y para esto debe quedar bien orientado sobre la superficie. Esto significa que la fracción constante o base de la Y quede en contacto con la superficie y los dos brazos o fracción variable quede disponible para la detección del antígeno. En este caso, se podría decir que cada anticuerpo (tipo IgG) puede unirse a dos antígenos (Villamizar R, 2009).

La propiedad magnética es aprovechada por tanto para concentrar y separar los antígenos a través de la aplicación de un campo magnético externo. La IMS ha sido propuesta para la detección selectiva de partículas virales intactas o infecciosas. Esta técnica ha sido acoplada a métodos moleculares y ha posibilitado la

5 identificación y cuantificación de virus entéricos tales como Hepatitis A (Lee, K., et al., 2012), Adenovirus (Haramoto E et al., 2010) Rotavirus (Yang W et al, 2011) a partir de diferentes muestras ambientales eliminando interferentes, incluido inhibidores de PCR.

10 Es así como, en esta patente se presenta una técnica mejorada de la IMS a la que se ha denominado **“Separación Fluoro-Inmuno-Magnética”** de partículas virales, que emplea un tipo de partícula que integra las propiedades magnéticas y de fluorescencia, para permitir eventos de separación, concentración viral y visualización en paralelo. De esta forma, se tiene un mejor control sobre el proceso

15 de detección viral. Las partículas son funcionalizadas gracias a una cubierta rica en grupos aminos presente en su superficie, lo que facilita la unión covalente del anticuerpo en posición correcta y, por tanto, la detección sensible y selectiva de diferentes tipos de virus entéricos con implicaciones a nivel de salud pública. La utilización de anticuerpos como elementos de reconocimiento asegura la detección

20 de partículas virales infecciosas sin la necesidad de emplear técnicas adicionales de cultivo en líneas celulares para evidenciar infectividad. Para confirmar la presencia del virus se hace necesario hacer extracción de material genético y para esto se emplea un kit comercial de rápida y sencilla aplicación. De esta forma, a través de la utilización de esta técnica, se abre un espectro de posibilidades en

25 detección, ya que al emplear anticuerpos específicos se puede reconocer diferentes tipos de patógenos que incluye cualquier tipo de virus entérico e incluso quistes de parásitos, los cuales también se encuentran muy diluidos en aguas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

30 La figura 1 muestra una forma esquemática del proceso de funcionalización de las micropartículas fluoro-magnéticas, en donde las partículas magnéticas poseen un core o núcleo fluorescente y una capa externa magnética la cual se encuentra modificada con grupos aminos que facilita la unión de anticuerpos monoclonales para diferentes tipos de virus entéricos (i.e. Rotavirus, Adenovirus, Hepatitis A,

35 Norovirus, Enterovirus) a través de los grupos carboxilos presentes en la fracción cristalizable (Fc) de la glicoproteína. Esto garantiza la orientación adecuada del

anticuerpo, permitiendo dos sitios para unión al antígeno. Después de cada paso de la funcionalización, las partículas son lavadas tres veces con PBS y agua destilada estéril para remover los anticuerpos que no fueron adsorbidos a las partículas.

5 La figura 2 muestra la Representación Esquemática del Proceso de Captura, Concentración y Separación de Virus empleando micropartículas magneto-inmuno-fluorescentes, en donde la propiedad magnética de las partículas es usada para concentrar y separar el virus de interés presente en la muestra de agua, a través de la aplicación de un campo magnético externo.

10

La figura 3 enseña la caracterización Microscopía Confocal de las Micropartículas Magnéticas. A) Micropartículas solas B) Micropartículas funcionalizadas con anticuerpo monoclonal anti-Rotavirus C) Formación de cúmulos (clústers) inducidos por la presencia de Rotavirus (10^3 partículas virales/mL) en la muestra.

15

La figura 4 es una microscopía de Fuerza Atómica A) Micropartícula Fluoro-magnética B) Partícula viral de Rotavirus C) Micropartículas Biofuncionalizadas con anti-Rotavirus D) Complejo micropartícula-anticuerpo-virus después de haber sido expuestas a 10^3 partículas virales de Rotavirus, en donde se puede evidenciar la presencia de virus sobre la superficie de las partículas, siendo más evidente la agrupación formada sobre la parte inferior adsorbidos a través de los anticuerpos.

20

La figura 5 son imágenes obtenidas con TEM empleando tinción negativa de A) Microfotografía de Micropartículas magnéticas funcionalizadas después de haber sido expuestas a 10^6 partículas virales de Rotavirus B) Micropartícula magnética B) Zoom de los Virus (Rotavirus) unidos a las micropartículas magnéticas.

25

La figura 6 corresponde a una curva de calibración realizada con concentraciones diferentes de la vacuna Rotateq (contiene 5 serotipos diferentes de Rotavirus a una concentración inicial de 10^6 PV/mL) y los datos obtenidos para la recuperación del RNA usando partículas fluoro-inmunomagnéticas de acuerdo con la presente invención.

30

La figura 7 muestra la electroforesis en gel de agarosa 1.8% que muestra la amplificación de una región de la proteína VP6 presente en la cápside de Rotavirus.

35

La figura 8 es una electroforesis en gel de agarosa 1.8% que muestra la amplificación del RNA obtenido a partir de las pruebas de selectividad y de unión no específica a micropartículas fluoro-magnéticas funcionalizadas o no con el anticuerpo anti-Rotavirus

5

La figura 9 es una representación esquemática del pretratamiento de aguas crudas previo análisis con la técnica de Separación Fluoro-Inmuno-Magnética

La figura 10 corresponde a una curva de calibración realizada en muestras de agua cruda pre-tratada, esterilizada y contaminada artificialmente con diferentes concentraciones de Rotateq

La figura 11 muestra la caracterización por microscopía de Fluorescencia de los complejos micropartículas-anticuerpo después de haber sido expuestos a aguas crudas con potencial contenido de Rotavirus y Hepatitis A

La figura 12 corresponde a las imágenes obtenidas con TEM empleando tinción negativa de A) Virus de la Hepatitis A (VHA) B) Rotavirus obtenidos a partir de aguas crudas

20

La figura 13 muestra la cuantificación del RNA viral obtenido a partir de muestras de agua cruda obtenidas a partir de 4 plantas de potabilización y sus respectivas fuentes hídricas abastecedoras empleando la técnica de separación Fluoro-Inmuno-Magnética

25

La figura 14 es una electroforesis en gel de agarosa 1.8% que muestra la amplificación de una región de la proteína VP6 y VP1 específicas para Rotavirus y Virus de la Hepatitis A, respectivamente separados, concentrados y detectados usando la técnica de separación Fluoro-Inmuno-Magnética a partir de aguas crudas de 4 plantas potabilizadoras y sus respectivas fuentes de abastecimiento hídrico.

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, consiste en funcionalizar micropartículas fluoro-magnéticas, las cuales poseen en su superficie grupos aminos que permiten la unión de forma covalente a los grupos carboxilos presentes en la fracción constante (Fc) de anticuerpos específicos para

35

diferentes tipos de virus entéricos (como por ejemplo Rotavirus, Hepatitis A, Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus, entre otros). La técnica comprende las siguientes etapas:

- a) Hacer reaccionar una solución de micropartículas fluoro-magnéticas con anticuerpos monoclonales específicos para diferentes tipos de virus entéricos durante 30 minutos a 2 horas a una temperatura entre 33 y 37°C;
 - b) Magnetizar las micropartículas
 - c) Lavar el exceso de anticuerpo con PBS 0.15 mM con pH 7.4.
 - d) Resuspender las micropartículas funcionalizadas con los anticuerpos en PBS 0.15 mM conteniendo BSA y
 - e) Agregar el agua con potencial contenido viral hasta completar un (1) litro;
 - f) Hacer la inmuno-reacción durante un período entre 1 a 3 horas a temperatura ambiente con agitación constante entre 120 y 150 rpm;
 - g) Aplicar un campo magnético,
 - h) Descartar el agua y recuperar los complejos magnetizados en PBS 0.15 mM con pH 7.4.
 - i) Caracterizar microscópicamente el complejo (micropartícula-anticuerpo-virus) a través de microscopía confocal y/o fluorescencia y microscopía electrónica;
- Adicionalmente, la técnica de detección fluoro- inmunomagnética de virus entéricos en aguas también puede comprender las etapas adicionales de
- j) Choque térmico a 90°C por 15 segundos a -4°C por 15 segundos de los complejos magnetizados del paso h)
 - k) Centrifugación de la solución del paso j) a 5000 rpm durante 15 minutos
 - l) Cuantificación del RNA viral del sobrenadante.

El proceso detalladamente se lleva a cabo tomando 250 µL de una solución de micropartículas fluoro-magnéticas (0.001% p/p) y se mezclan con 250 µL del anticuerpo (10 µg/mL), dejándolos reaccionar durante un período de 30 minutos a 2 horas, de preferencia 1 hora a una temperatura entre 35 a 40°C, de preferencia 37°C. Seguidamente, las partículas son magnetizadas y el exceso de anticuerpo es lavado dos veces usando PBS 0.15 mM pH 7.4 conteniendo 0.1% de BSA y una vez con agua destilada estéril.

Posteriormente, las micropartículas funcionalizadas son resuspendidas en 250 µL de PBS 0.15 mM pH 7.4 y son depositadas a 1 Lt de agua con potencial contenido viral. La inmunoreacción se lleva a cabo durante un período entre 1 a 3 horas, de preferencia 2 horas a temperatura ambiente, en agitación constante, a una
 5 velocidad de entre 80 y 150 rpm, de preferencia 120 rpm. Finalmente, un campo magnético externo es aplicado con el fin de concentrar y separar el complejo. El agua es descartada y posteriormente los complejos magnetizados son recuperados en 250 µL PBS 0.15 mM pH 7.4.

10 50 µL del complejo (micropartícula-anticuerpo-virus) se caracteriza a través de microscopía confocal o de fluorescencia, para comprobar el proceso de separación inmunomagnética y la formación de agregados. En caso de existir altas concentraciones de virus en la muestra analizada, se pueden apreciar la formación de agrupaciones de partículas (clústers de 20-50 partículas).

15 El volumen restante (200 µL), es sometido a un choque térmico (90°C/15 segundos -4°C/15 segundos) para romper la interacción antígeno-anticuerpo y así liberar los viriones unidos a las partículas. Posteriormente se centrifuga a 5000 rpm/15 min y el sobrenadante se emplea para hacer extracción y cuantificación del RNA viral y
 20 de esta forma confirmar la presencia del virus. El pellet conteniendo las micropartículas es colectado y reutilizado para otros ensayos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN MUESTRAS DE AGUA 25 ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA

OBJETIVO

Detectar Rotavirus en muestras de agua destilada estéril artificialmente contaminada, empleando la técnica de separación fluoro-inmuno-magnética.

METODOLOGÍA

1. Se preparó una solución 0.001% de las micropartículas magneto-fluorescentes y se funcionalizaron con el anticuerpo anti-Rotavirus (10 µg/mL) (Figura 1). Seguidamente, 500 µL de las micropartículas funcionalizadas fueron expuestas
 35 a 1 Lt de agua destilada estéril contaminada artificialmente con 1 a 10⁶ partículas

virales/mL. Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de separación fluoro-inmuno-magnético como se explicó en el numeral 2 (Figura 2).

2. Para comprobar la eficiencia en la separación, se llevó a cabo una caracterización por microscopía confocal de las partículas antes, durante y después del proceso de detección viral (Figura 3).

3. Adicionalmente, para verificar si la formación de agrupaciones en las partículas eran inducidas por la presencia de virus, se llevaron a cabo análisis adicionales de formación de clústers, Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y microscopía electrónica (TEM) (Figura 4-5).

4. La interacción antígeno-anticuerpo se rompió aplicando choque térmico (90°C/15 segundos-4°C/15 segundos). Posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm/15 minutos para facilitar la recuperación de los virus y la precipitación de las micropartículas fluoro-magnéticas.

5. A los virus recuperados se les realizó extracción y cuantificación de RNA. Los resultados fueron comparados con una curva patrón construida a partir del RNA obtenido directamente de la vacuna Rotateq diluida seriadamente a las concentraciones trabajadas (Figura 6).

6. El RNA extraído fue denaturado a 95 °C por 5 min y colocado inmediatamente en hielo por 5 min adicionales previo a llevar a cabo la RT-PCR OneStep Superscript III. El material genético amplificado fue revelado en electroforesis en gel de agarosa 1,8 % (Figura 7).

7. La selectividad del complejo micropartícula-anticuerpo en presencia de interferentes presentes comúnmente en el agua fue determinada. Para tal fin, se empleó una muestra de heces fecales presuntamente contaminada con poliovirus y otros virus entéricos, provista por el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS). Las micropartículas inmuno-fluoromagnéticas fueron funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus, como se describió anteriormente. Seguidamente se expusieron a 1L de agua contaminada las heces del paciente y se realizó la inmuno-reacción. Los virus concentrados fueron separados de las micropartículas magnéticas y posteriormente el RNA viral fue extraído y cuantificado. La presencia de interferentes se confirmó empleando RT-PCR OneStep Superscript III y se reveló en electroforesis en gel de agarosa 1,8 % (Figura 8). El corrido electroforético se llevó a cabo por triplicado.

8. De la misma forma, se comprobó la posible adsorción no específica al complejo micropartícula-anticuerpo. Para tal fin se tomaron micropartículas fluoro-

magnéticas sin funcionalizar, es decir, sin el anticuerpo y se depositaron a 1L de agua previamente contaminada con Rotateq (i.e. 10^6 PV/mL). La muestra fue magnetizada, lavada con agua PBS y agua destilada estéril. Posteriormente se aplicó choque térmico a fin de separar los virus unidos y se realizó extracción de RNA. La presencia de interferentes se confirmó empleando RT-PCR OneStep Superscript III y se reveló en electroforesis en gel de agarosa 1,8 % (Figura 8). El corrido electroforético se llevó a cabo por triplicado.

RESULTADOS

En la figura 3A se aprecian las micropartículas magnéticas antes del proceso de funcionalización. Se puede evidenciar que las micropartículas se encuentran dispersas en el medio. Esto se debe a la repulsión electrostática que se genera por la carga positiva de los grupos aminos presentes en la superficie de las partículas. En la figura 3B, se aprecian las micropartículas funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus. Puede observarse pequeños agregados de micropartículas (2 o 3 partículas) debido a la diferencia de cargas de los aminoácidos que componen el anticuerpo. Finalmente, en la figura 3C, se observa la formación de grandes agrupaciones (grupos de 5 a +30 partículas) como consecuencia de la exposición de las micropartículas a altas concentraciones del virus (10^6 partículas Rotateq/mL). La presencia del virus hace que las partículas se auto-ensamblen, generando agrupaciones (clústers) que varían de tamaño en función de la cantidad de virus presentes en la muestra. Este evento ha sido previamente descrito por Pérez JM y colaboradores (Pérez JM et al, 2003).

Para confirmar que la formación de agregados era mediada por virus, se llevó a cabo la caracterización a través de Microscopía de Fuerza Atómica. A través de esta técnica se determinó un diámetro inicial de las micropartículas de 562 nm (Figura 4A), lo cual se corresponde con la ficha técnica del producto. Una vez las micropartículas fueron funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus, su diámetro aumentó aproximadamente en 10 nm (Figura 4C). La altura de una IgG es de 12 nm en posición vertical, esto significa, con la región Fab apuntando al analito. No obstante, debido al mecanismo de absorción sobre los grupos aminos, se pueden presentar rotación de la biomolécula permitiendo movimientos rotacionales (Tronin, A. et al., 1995) que generan variaciones en los valores (i.e. desde 10 nm a 12 nm).

Después de que las partículas funcionalizadas fueron expuestas al virus incrementaron significativamente su diámetro. La figura 4B muestra que una partícula viral de Rotavirus, alcanza un diámetro promedio de 100 nm, mientras que en la figura 4D puede evidenciarse la formación de un cúmulo de virus adsorbido a la superficie de las partículas funcionalizadas. Allí los virus son detectados a través de la interacción antígeno-anticuerpo mediada por fuerzas supramoleculares.

Muestras de la misma naturaleza fueron caracterizadas por microscopía de transmisión electrónica (TEM) con el fin de visualizar mejor el complejo y comprobar la presencia de los virus. En la figura 5, puede apreciarse la morfología de una micropartícula magnética, de una partícula de Rotavirus y del complejo micropartícula-anticuerpo-virus, confirmando así los hallazgos obtenidos a través de la caracterización con AFM.

La caracterización molecular permitió confirmar la presencia de Rotavirus. La figura 6 muestra la curva de calibrado empleando un stock de Rotateq a diferentes concentraciones (i.e. 10 a 10^6 partículas virales) y el RNA recuperado de los mismos stocks diluidos en 1 Lt de agua empleando las micropartículas fluoro-inmuno-magnéticas. Se puede apreciar que a mayor contenido viral mayor cantidad de RNA viral en las muestras.

De igual forma, se puede apreciar en la gráfica, que los virus diluidos en 1 Lt de agua son eficientemente separados y concentrados, con porcentajes de recuperación promedio de 80.68 %. Lo anterior indica que en muestras de agua potable o pura existen muy pocos interferentes capaces de reducir la detección viral.

Además, se quiso comprobar que el RNA extraído, efectivamente perteneciera a Rotavirus y no a posibles interferentes de la matriz absorbidos de forma no específica a las micropartículas. De esta forma se procedió a amplificar y revelar el material genético. La figura 7 muestra el marcador de peso molecular, un control negativo (C-) y el control positivo (C+) correspondientes al segmento de 211 pb de la proteína de cápside VP6. Los pozos 7, 8 y 9 muestran las bandas obtenidas para 10^6 PV, 10^3 PV y 10^1 PV de Rotateq diluidos en 1 litro de agua, separados y concentrados por separación fluoro-inmunomagnética mientras que los pozos 12 al 14, muestran las bandas obtenidas para las mismas concentraciones virales hechas concentradas por ultrafiltración tangencial (UFT) como método de referencia. Los

resultados permitieron evidenciar que la técnica de Separación Fluoro-inmuno-
magnética es tan efectiva como la UFT en la concentración viral. Además presenta
la gran ventaja de requerir solo 2 horas para hacer la concentración del virus y de
no necesitar pasos posteriores de cultivo celular para determinar la infectividad de
5 las partículas virales detectadas.

En cuanto a la prueba de selectividad, se logró hacer la concentración y separación
de partículas virales. Al realizar la extracción de material genético se obtuvo un total
de 17.9 ng/μl de RNA viral. Este mismo fue amplificado y revelado. Las bandas
10 ubicadas en los pozos 1 y 2 fueron muy tenues. No obstante, la banda ubicada en
el pozo 3 del corrido electroforético, se correspondió con el segmento 211 pb de la
proteína de cápside VP6. Por tanto, se concluyó que la muestra tomada para
análisis contenía entre otros virus entéricos, Rotavirus, que hizo que el anticuerpo
monoclonal lo reconociera y posteriormente, a través de la técnica empleada se
15 pudiera concentrar, separar y detectar (Figura 8).

Finalmente, los ensayos de adsorción no específica evidenciaron la alta
especificidad del complejo ya que se logró cuantificar tan solo 0.6 ng/μL de RNA
después de emplear solo las micropartículas fluoro-inmunomagnéticas sin
20 anticuerpo y expuestas a Rotavirus. En la amplificación y revelado no se logró
evidenciar la presencia de ningún virus perteneciente al género Rotavirus (Figura 8-
pozos 4-6). Este ensayo mostró que en ausencia del elemento de reconocimiento
(anticuerpo anti-Rotavirus) no se dan eventos de adsorción inespecífica sobre el
complejo, lo cual puede atribuirse al uso del buffer de bloqueo empleado al cual se
25 le adicionó BSA.

Ejemplo 2: DETECCIÓN DE ROTAVIRUS Y HEPATITIS A EN MUESTRAS DE AGUA CRUDA PROVENIENTE DE 4 PLANTAS DE POTABILIZACIÓN DEL DEPARTAMENTO NORTE DE SANTANDER

OBJETIVO

Determinar la eficiencia de la técnica de separación fluoro-inmunomagnética en la
detección de virus entéricos en matrices complejas.

METODOLOGÍA

TOMA DE MUESTRAS-PRETRATAMIENTO

Se realizó muestreo compuesto de aguas crudas provenientes de cuatro plantas de tratamiento ubicadas en el departamento Norte de Santander, tanto en la etapa de captación, así como de la fuente de procedencia (Río Pamplonita y Río Zulia). Las muestras fueron recogidas en frascos de vidrio estériles y se transportaron al laboratorio para su procesamiento. Debido a la naturaleza de la muestra (aguas crudas con altas concentraciones de materia orgánica), se realizó un pretratamiento que consistió en realizar dos procesos sucesivos de filtración de material grosero empleando algodón y posteriormente una centrifugación a 3500 rpm/10 minutos como se muestra en la figura 9.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Una muestra de agua compuesta, obtenida a partir de la mezcla de 250 mL de agua cruda pre-tratada de cada una de las plantas fue esterilizada con calor húmedo a 121°C/15 min con el fin de eliminar posible presencia de contaminantes biológicos y virológicos. Las muestras de agua fueron contaminadas artificialmente con 1 a 10⁶ partículas virales/mL de Rotateq con el fin de realizar una curva de calibración que se comparó con el stock del virus sin diluir en agua cruda pretratada y determinar así los porcentajes de recuperación viral en matrices complejas. Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de separación fluoro-inmuno-magnético y caracterización molecular como se explicó en el numeral 2.

ENSAYOS DIRECTOS EN AGUAS CRUDAS

Se tomaron muestras de 1 Lt de agua proveniente de cada planta de potabilización, así como de su fuente de procedencia, se filtraron (con papel filtro y algodón), se centrifugaron y se le adicionaron micropartículas fluoro-magnéticas con anticuerpos monoclonales anti-Rotavirus y anti-Hepatitis siguiendo los mismos pasos explicados en el numeral 2. La inmunoreacción se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el numeral 2 al igual que la concentración y la separación fluoro-inmuno-magnética. Los complejos fueron caracterizados por microscopía de fluorescencia para determinar la presencia de clústers. Además, la presencia de los virus fue evidenciada a través de microscopía electrónica y mediante caracterización molecular, realizando la extracción, cuantificación, amplificación y revelado por electroforesis de las partículas virales.

RESULTADOS

Se puede apreciar en la figura 10 los valores obtenidos para la extracción de RNA viral a partir de aguas crudas y comparados con el patrón. Estadísticamente los datos fueron ajustados a través del modelo de regresión lineal donde se obtuvo un $R^2=0.923$, lo que indica que se encuentra en el intervalo $0,9 \leq R^2 < 1$, para una correlación excelente entre los datos.

Se pudo establecer que, debido a la naturaleza compleja de la muestra, el nivel de sensibilidad de las partículas fluoro-inmuno-magnéticas disminuye en promedio un 36.51% con respecto a los ensayos realizados en agua destilada estéril y presentados en el ejemplo 1 (Figura 6). No obstante, el porcentaje de virus recuperados es de 44,17% se encuentra por encima de otros estudios tales como el reportado por Haramoto E, en el que detectaron Norovirus humanos en muestras de agua de río empleando procesos de adsorción-elución usando filtros electronegativos, obteniendo porcentajes de recuperación del 15% (Haramoto E et al, 2009), mientras que el reportado por Fumian et al, solo alcanzó un 3.5 % en la misma matriz usando un método similar (Fumian et al, 2010). Comparando directamente con otros estudios en el que emplearon separación inmunomagnética (IMS), Ha J et al, reporta la recuperación del virus de la Hepatitis A y Norovirus a partir de alimentos mínimamente procesados alcanzando niveles promedio de 6.2 % y 8.5 %, respectivamente (Ha J et al, 2014). La técnica aquí desarrollada muestra que los niveles de sensibilidad alcanzada son debidos probablemente a la eficiencia del pretratamiento aplicado a las muestras antes de ser aplicado el complejo micropartícula-anticuerpo y la correcta adsorción del mismo a las partículas. Ya que asegurando que los anticuerpos tengan los dos sitios de unión al antígeno orientados en la posición adecuada se aumenta la sensibilidad en la detección.

La caracterización por microscopía de fluorescencia de los complejos virales tanto con Rotavirus como con Hepatitis A en las muestras de agua provenientes de las 4 plantas de potabilización del departamento, permitió evidenciar la presencia de clúster en todos los casos (Figura 11A-B).

Posteriormente, se rompió la interacción antígeno-anticuerpo para facilitar la liberación de las partículas virales, las cuales fueron caracterizadas a través de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) (Figura 12). El virus de la hepatitis A (VHA) comparte rasgos morfológicos y estructurales básicos de otros grupos de

la familia, como los enterovirus. Estructuralmente es circular, no envuelto con un tamaño de aproximadamente 30 nm de diámetro (Figura 12A). De otra parte, Rotavirus es un virus que presenta cápside icosaédrica, no envuelto de 50 a 65 nm de diámetro rodeada por una capa doble que confiere al virus aspecto de rueda, de ahí el nombre rotavirus. La triple capa proteica hace que el virus tenga un diámetro total de unos 80 nm de diámetro (Figura 12B).

Además, se realizó extracción y cuantificación de RNA viral de los dos virus (Figura 13) y para el caso de Rotavirus, los datos obtenidos se reemplazaron en la ecuación de la recta presentada en la figura 10. Se pudo determinar que este virus se encuentra en una concentración que oscila entre 6×10^5 PV/mL hasta $1,35 \times 10^6$ PV/mL en las diferentes muestras de aguas crudas analizadas provenientes de las 4 plantas de tratamiento analizadas incluyendo sus fuentes de abastecimiento.

La figura 14 muestra las bandas correspondientes a un segmento de la proteína VP6 presente en la cápside de Rotavirus y de un segmento de 192 pb correspondientes a la una región entre VP1 y 2A presentes en la cápside del VHA. Estos hallazgos permitieron comprobar la eficiencia de la técnica a la hora de detectar partículas virales de Rotavirus y Virus de la Hepatitis A en matrices complejas. El VHA es un virus altamente contagioso que presenta dosis infectivas bajas. Este es un virus entérico exhibe su tropismo por las células epiteliales de aparato digestivo, de donde se desplaza a través del torrente sanguíneo al hígado, órgano afectado responsable de producir la conocida "Hepatitis infecciosa".

Los anticuerpos monoclonales acoplados a las micropartículas magnéticas, permitieron el reconocimiento del antígeno VP1 presente en la cápside viral, lo que facilitó su concentración, separación y posterior detección en muestras de agua procedentes de la etapa de captación de 3 de las 4 plantas de potabilización analizadas (CAR, MON y POR) y en el agua proveniente del río Zulia, fuente hídrica que abastece de agua a una de las plantas estudiadas.

En el caso del género *Rotavirus* este se encuentra dividido en siete grupos serológicos que van desde el A al G, los cuales a su vez presentan varios subgrupos. El grupo A al C son patógenos para humanos, mientras que los restantes tienen más afinidad por animales. El grupo A es el más patógeno y frecuente en humanos. A través de la técnica de separación fluoro-

inmunomagnética, se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para la detectar el epítotope VP6 en la cápside viral de Rotavirus del grupo A. Los análisis realizados permitieron identificar su presencia en todas las fuentes de captación de las 4 plantas de potabilización analizadas y en las muestras de agua provenientes de los ríos Pamplonita y Zulia. Este hallazgo sin duda, genera un potencial riesgo para la salud pública de la población que emplea este tipo de aguas para recreación, riego e incluso consumo sin tratamientos adecuados de desinfección. La razón radica en el hecho de que este virus presenta una estructura morfológica basada en una triple capa protéica, lo que hace que sea catalogado como un virus altamente resistente a los procesos de cloración del agua en comparación con otros virus entéricos (OMS-Guías para la calidad del agua potable). Por tanto, procesos deficientes de desinfección del agua podrían permitir que el virus llegara a los consumidores a través de agua que puede estar desde el punto de vista bacteriológico, apta para el consumo humano.

CONCLUSIÓN

Se puede concluir que la técnica fluoro-inmunomagnética desarrollada permite la detección de Rotavirus y Hepatitis A, en muestras de agua estéril contaminada artificialmente, así como en matrices complejas tales como aguas crudas. La técnica presenta unas características de realización interesantes (Tabla 1), que la hacen atractiva para su aplicación en la detección de cualquier patógeno que se encuentre diluido en agua incluyendo quistes de parásitos, siempre que se empleen anticuerpos específicos.

REFERENCIAS

- Alavandi, S., Bharathi AR., Kumar S., Dineshkumar N., Saravanakumar C., Rajan JS. Tangential flow ultrafiltration for detection of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp pond water. Journal of Virological Methods. 2015. 218: 7-13
- Calgua B, Fumian T, Rusiñol M, Girones R. Detection and quantification of classic and emergin viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. Water Research. 2013. 47: 1797-2810
- Fumian TM, Leite JP, Castello AA, Gaggero A, Caillou MS, Miagostovich MP. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. Journal of Virology Methods. 2010. 170(1-2):42-6.

- Ha, JH, Choi, C., Ha, SD. Evaluation of Immunomagnetic Separation Method for the Recovery of Hepatitis A Virus and GI.1 and GII.4 Norovirus Strains Seeded on Oyster and Mussel. *Food and Environmental Virology*. 2014. 6:290-296.
- Haramoto E., Kitajima M, Katayama H, Ohgaki S. Real-time PCR detection of
 5 adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Research*. 2010. 44:1747–1752.
- Hamzaa I, Jurzik L, Überlab K, Wilhelm M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2011. 214: 424– 436.
- 10 Kiulia NM, Hofstra N, Vermeulen LC, Obara MA, Medema G and Rose JB. Global Occurrence and Emission of Rotaviruses to Surface Waters. *Pathogens*. 2015. 4: 229-255.
- Lee JH, Cheol G., Kimc JI., Yic HA, Lee CH. Development of a new cell culture-based method and optimized protocol for the detection of enteric viruses. *Journal of*
 15 *Virological Methods*. 2013. 191: 16– 23.
- Mortaza I. Analytical applications of chemiluminescence-detection systems assisted by magnetic microparticles and nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry*. 51
 2013. 51–70.
- Negrete, A., Pai, A., Shiloach, J. Use of hollow fiber tangential flow filtration for the
 20 recovery and concentration of HIV virus-like particles produced in insect cells. *Journal of Virological Methods*. 2014. 195: 240–246.
- Peláez D, Rodríguez JA, Rocha EL, Rey GJ. Estandarización de un método de concentración y detección de virus entéricos en aguas de consumo. *Biomédica*. 2010.30:2
- 25 Peláez D, Guzmán BL, Rodríguez J, Acero F, Nava G. Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: desafíos de los sistemas de abastecimiento. *Biomédica*. 2016: 36:169-78.
- Perez JM, Simeone FJ, Saeki Y, Josephson L, Weissleder R. Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles
 30 in biological media. *Journal of Analytical Chemistry Society*. 2003. 125, 10192-10193.
- Tronin, A., Dubrovsky, T., Nicolini, C. Comparative Study of Langmuir Monolayers of Immunoglobulin G Formed at the Air-Water Interface and Covalently Immobilized on Solid Supports. *Langmuir*. 1995. 11, 385–389.
- 35 Villamizar R, 2009. Biosensors base on carbón nanotube field effect transistors for detecting pathogenic microorganisms. *Universitat Rovira I Virgili*. ISBN:978-84-692-

9761-2/DL:T-203-2010. Disponible en www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9037/Villamizar.pdf

Yang W, Gu AZ, Zeng SY, Li D, He M, Shi HC. Development of a combined immunomagnetic separation and quantitative reverse transcription-PCR assay for sensitive detection of infectious rotavirus in water samples. Journal of Microbiological Methods. 2011. 84:447–453

Organización Mundial de la Salud OMS 206. Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1: Recomendaciones. Tercera edición. ISBN 92 4 154696 4. Disponible en: www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es

Tabla 1. Parámetros de realización de la técnica

PARÁMETRO DE REALIZACIÓN	RESULTADO
Tiempo de Detección	2 horas
Sensibilidad	>80 %
Límite de Detección	10 partículas virales/1L agua crudas o potables
Sencillez	El procedimiento de funcionalización de la micropartícula magnética y de concentración de virus a partir de la muestra de agua se da en dos pasos y no requiere de ligandos químicos
Selectividad	Se detecta un solo grupo de virus debido al uso de anticuerpos monoclonales y estos mismos facilitan la detección de partículas virales completas infectivas, por lo cual no se hace necesario técnicas adicionales de detección tales como cultivo celular
Costo	Se puede hacer producción en masa de anticuerpos policlonales en modelos murinos para disminuir costos

Nota: Cabe destacar que todos los resultados obtenidos fueron validados por el grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS) quienes son referentes de este tipo de análisis en agua en el país.

P-11147 (Solicitud No. NC2016/0005568)
Reivindicaciones Modificadas – RTA AO 12429
14 de enero de 2019

5

REIVINDICACIONES

1. Una técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos seleccionado de adenovirus, astrovirus, enterovirus, virus Hepatitis A, norovirus, rotavirus, entre otros puede ser detectado en aguas; la técnica comprende las siguientes etapas:
 - a) Hacer reaccionar una solución de micropartículas fluoro-magnéticas con anticuerpo durante 30 minutos a 2 horas a una temperatura entre 33 y 37°C
 - b) Magnetizar las micropartículas;
 - c) Lavar el exceso de anticuerpo con PBS 0.15 mM pH 7.4;
 - d) Resuspender las micropartículas funcionalizadas en PBS 0.15 mM conteniendo BSA; y
 - e) Agregar el agua con potencial contenido viral hasta completar un (1) litro;
 - f) Hacer la inmunoreacción durante un período entre 1 a 3 horas a temperatura ambiente con agitación constante entre 120 y 150 rpm;
 - g) Aplicar un campo magnético;
 - h) Descartar el agua y recuperar los complejos magnetizados en PBS 0.15 mM pH 7.4;
 - i) Caracterizar microscópica y molecularmente el complejo (micropartícula-anticuerpo-virus).
2. La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque: en la etapa a) la concentración de las micropartículas-fluoromagnéticas es de 0.001% p/p y la concentración del anticuerpo es de 10 µg/mL.
3. La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la etapa C) se lleva a cabo una vez con PBS 0.15 mM pH 7.4, una vez con PBS 0.15 mM pH 7.4 conteniendo 0.1% de BSA y una vez con agua destilada estéril.
4. La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la etapa de caracterización se lleva a cabo mediante Microscopía Confocal o Microscopía de Fluorescencia, Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y/o Microscopía Electrónica (TEM).

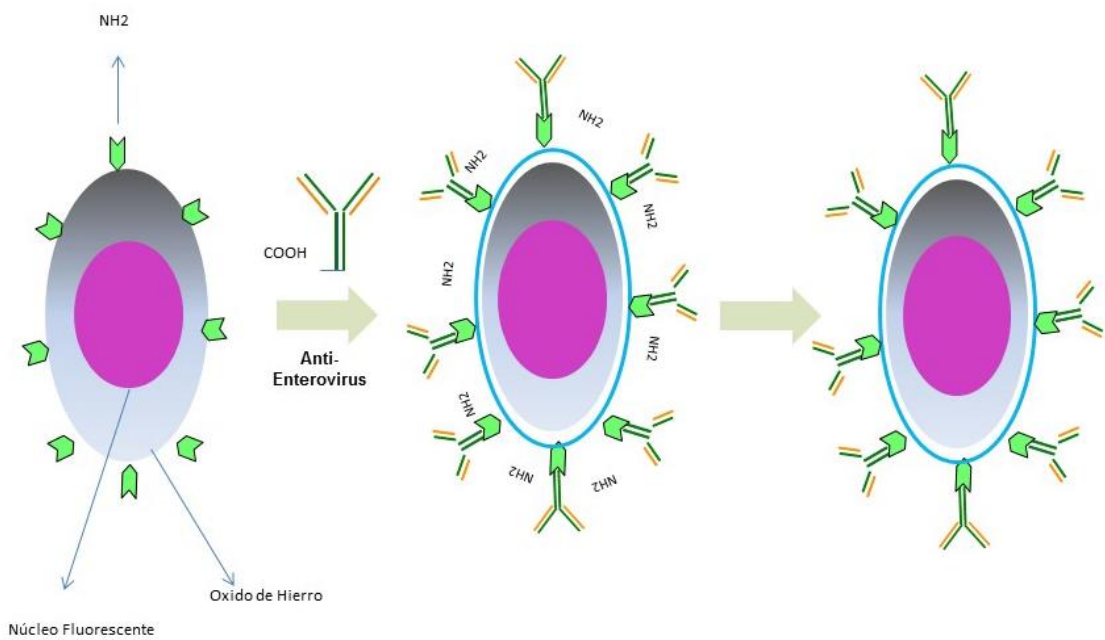
5. La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende las etapas adicionales:

- 5 j) Choque térmico a 90°C por 15 segundos a -4°C por 15 segundos de los complejos magnetizados del paso h)
- k) Centrifugación de la solución del paso j) a 5000 rpm durante 15 minutos
- l) Cuantificación del genoma viral a partir del sobrenadante.

RESUMEN

La invención se encuentra dirigida a una técnica de detección de virus entéricos en aguas, que emplea micropartículas que poseen propiedades magnéticas y al mismo tiempo de fluorescencia. Para tal fin, se hace reaccionar una solución de micropartículas fluoro-magnéticas con anticuerpos monoclonales, las cuales son expuestas a la presencia del patógeno el cual se encuentra diluido en 1 litro de agua. Posteriormente los patógenos son magnetizados a través de la aplicación de un campo magnético externo que posibilita la concentración, separación y posterior detección a través de técnicas sencillas de microscopía y/o moleculares.

FIGURAS



5

FIG 1

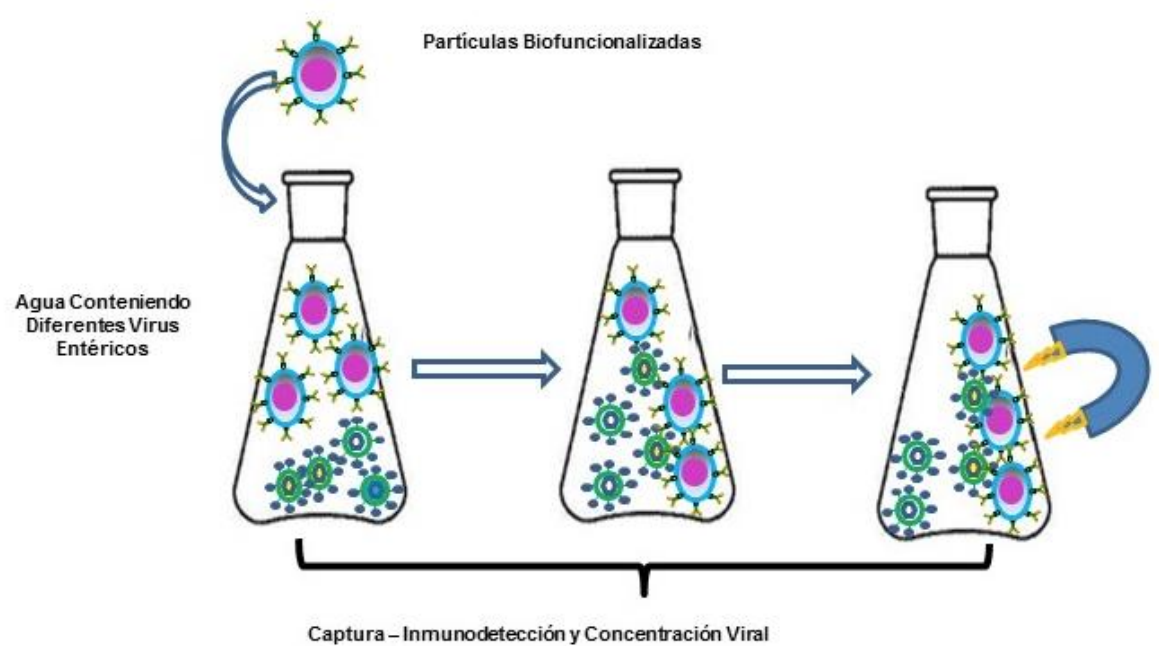
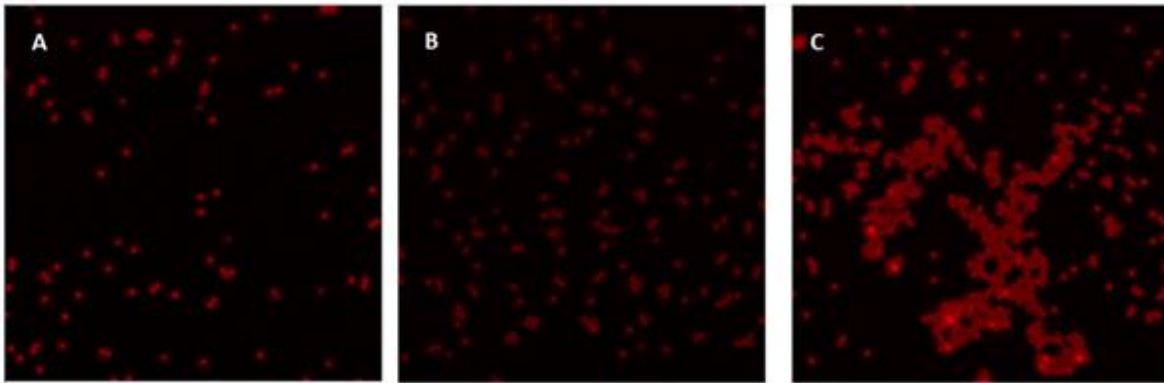


FIG 2

**FIG 3**

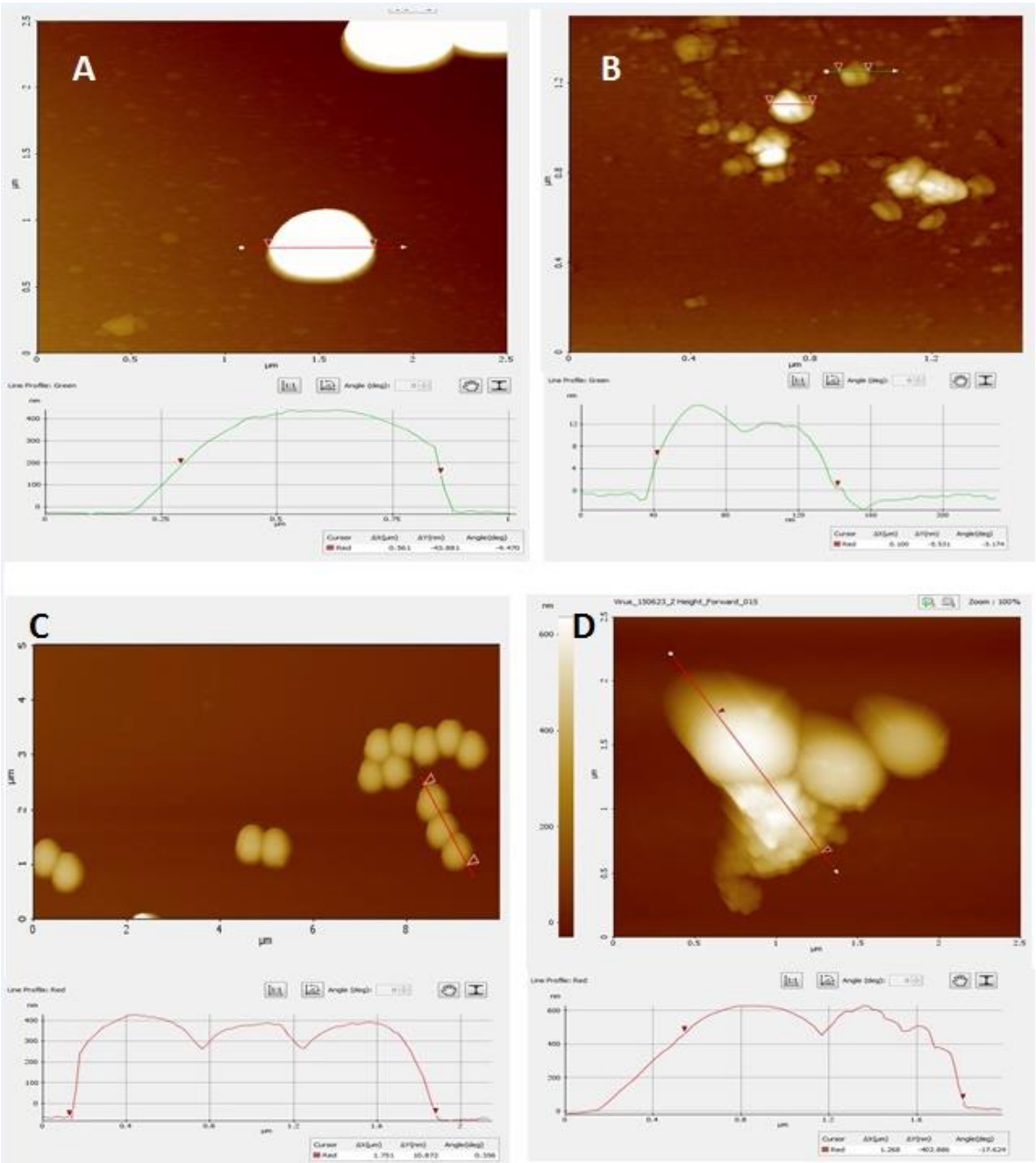


FIG 4

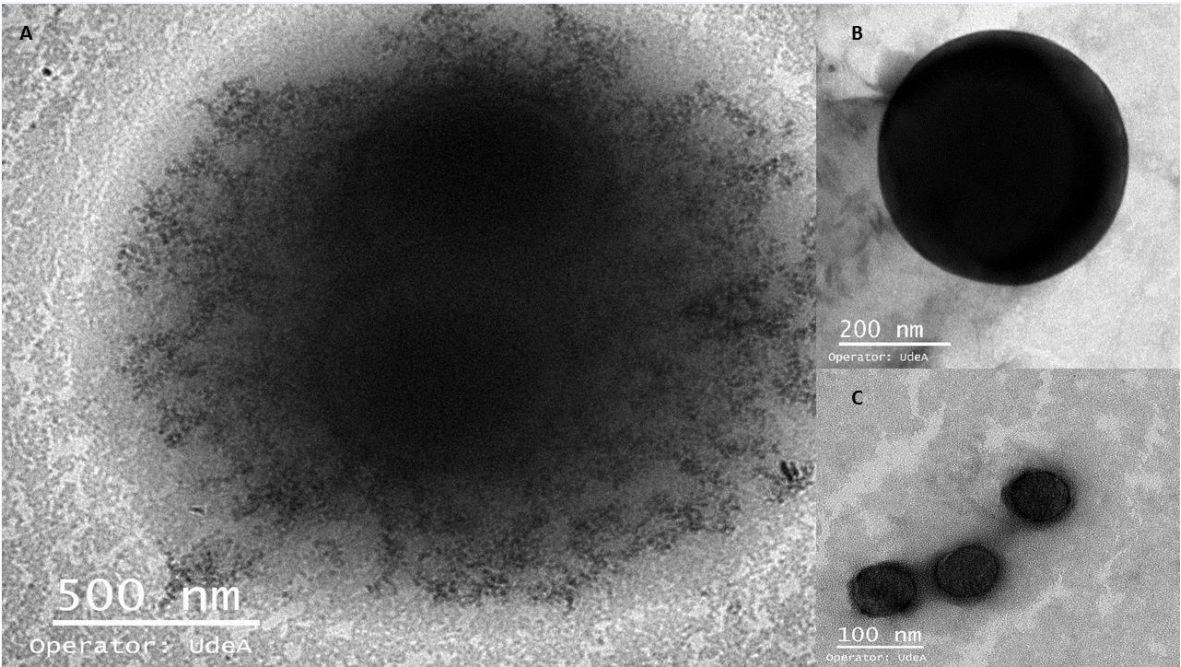


FIG 5

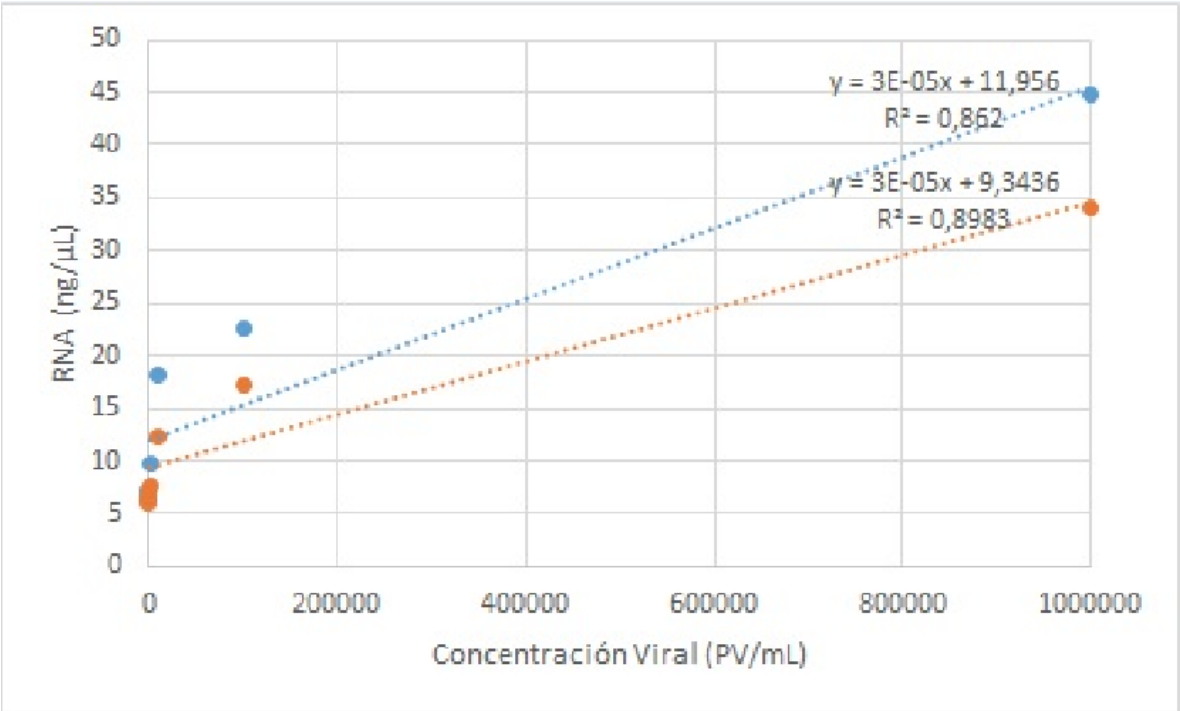
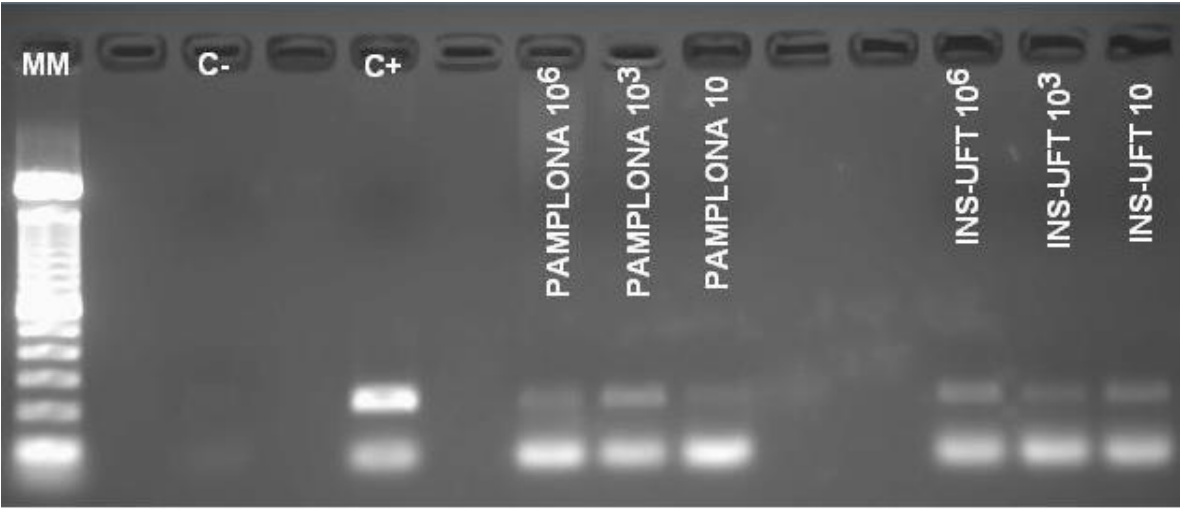


FIG 6



5

FIG 7

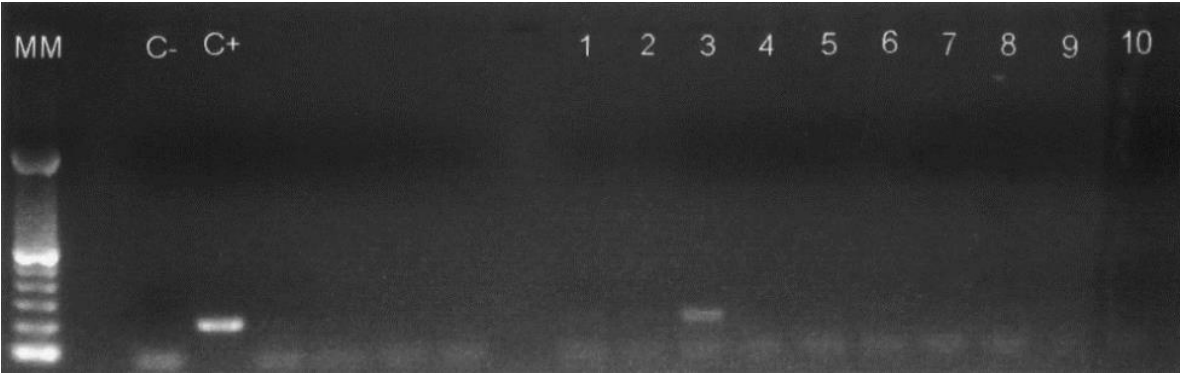
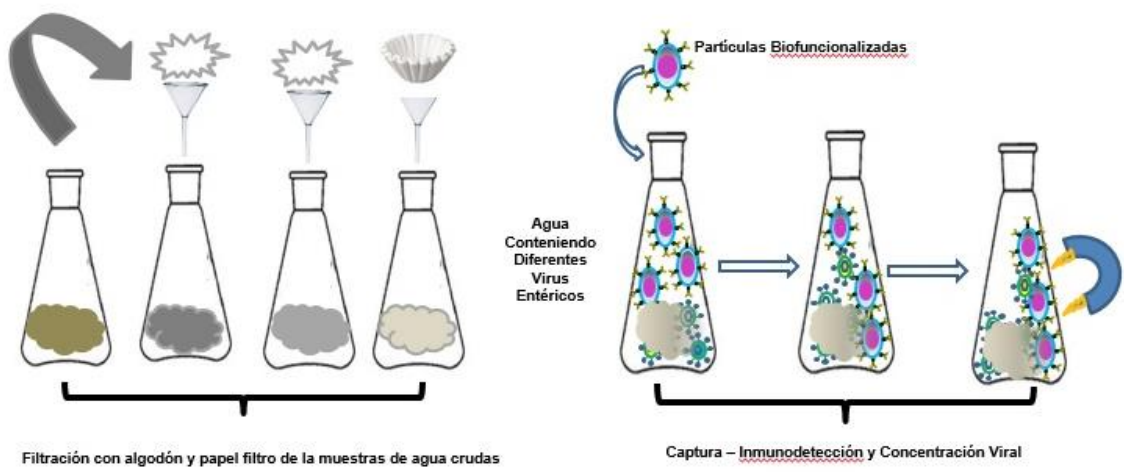


FIG 8



5

FIG 9

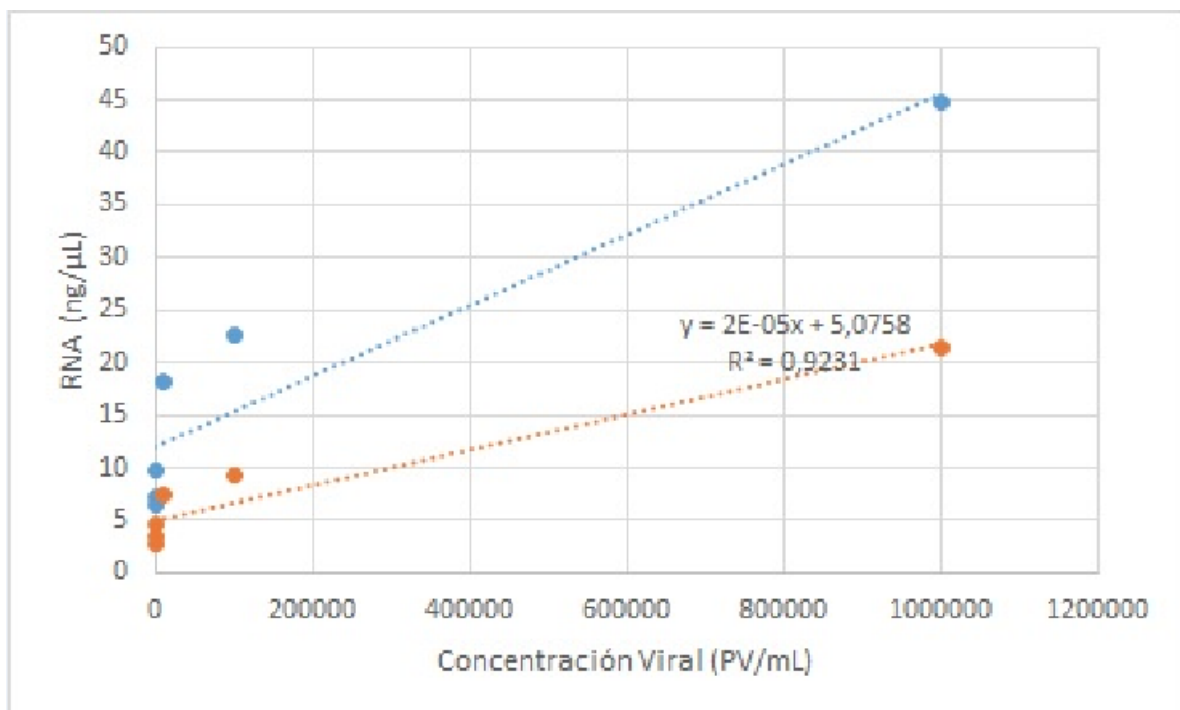
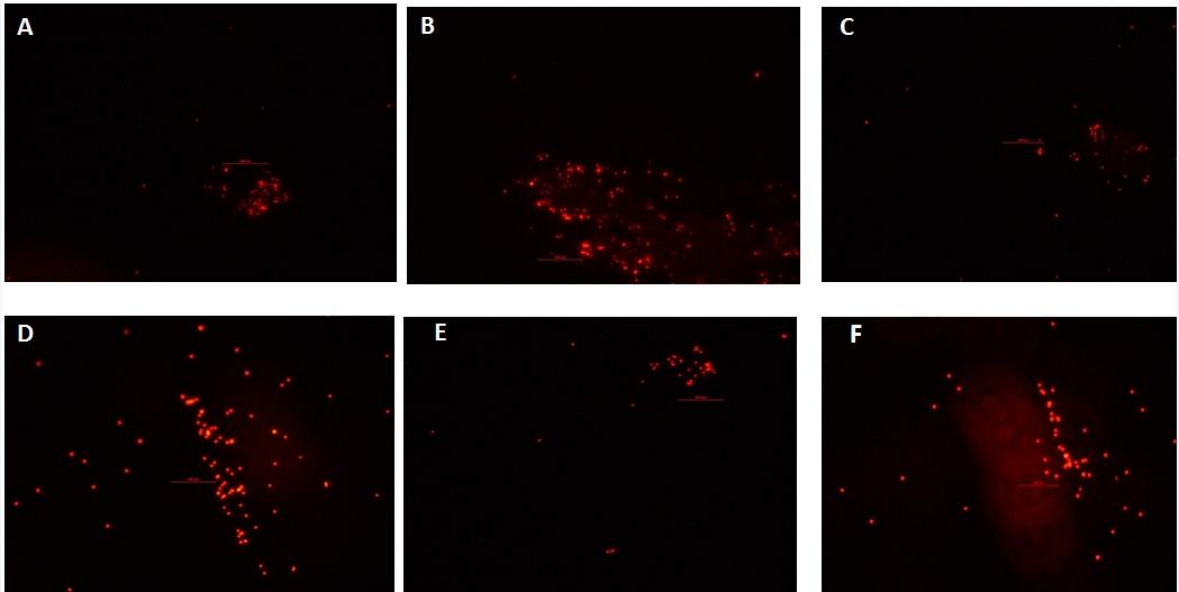
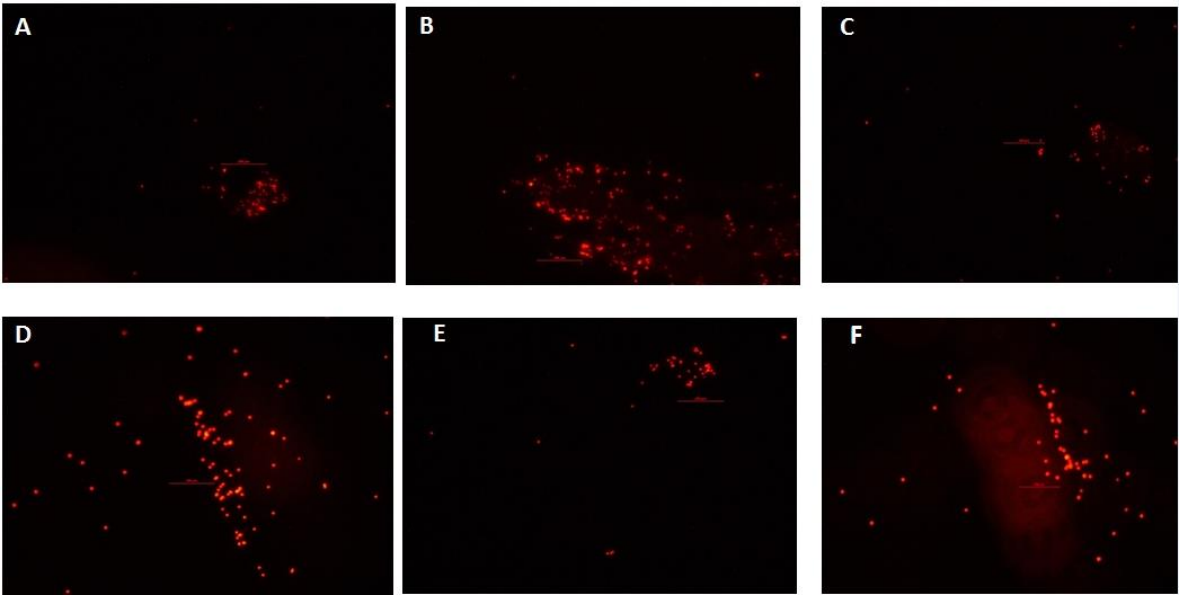


FIG 10



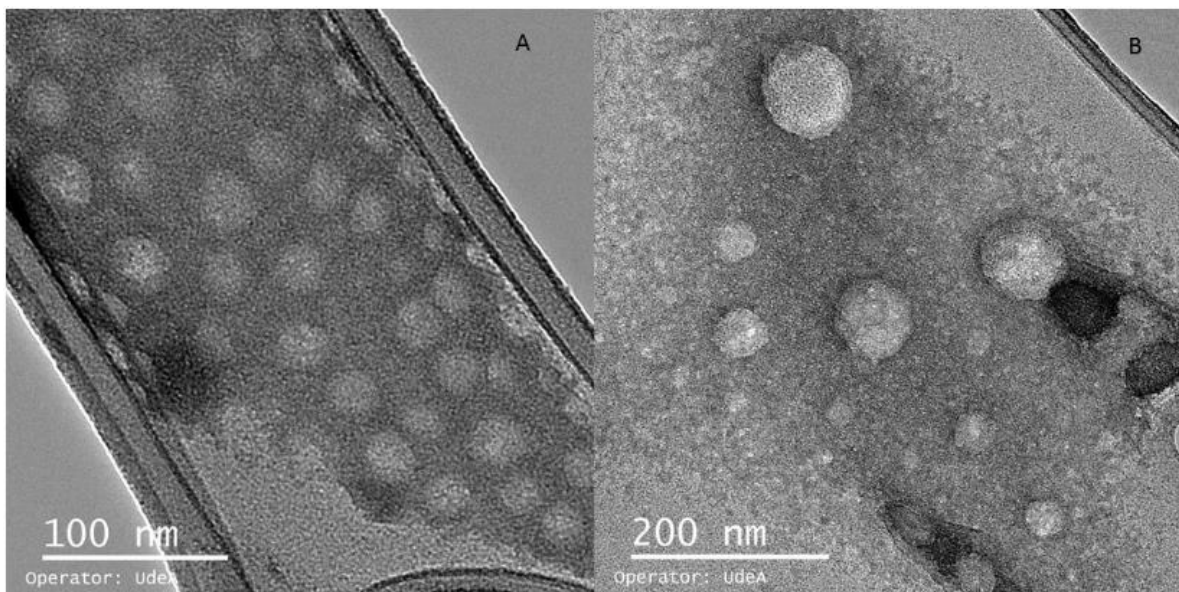
5

FIG 11A



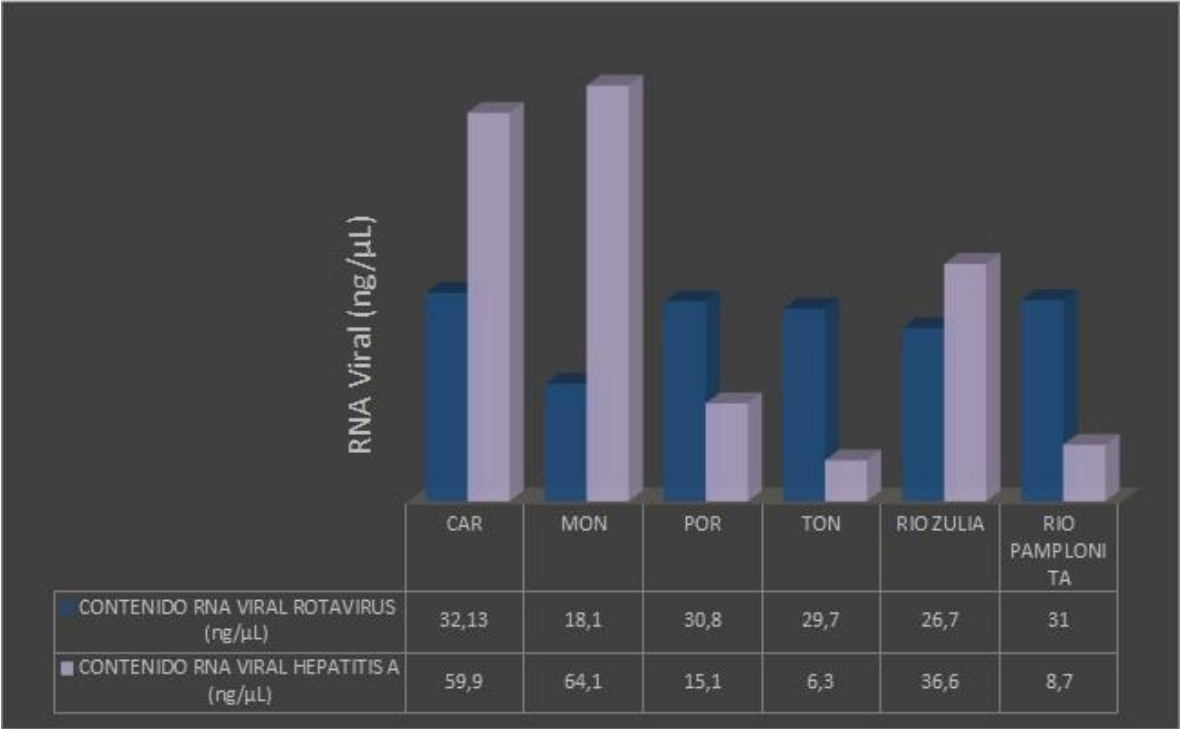
10

FIG 11B



5

FIG 12



5

FIG 13

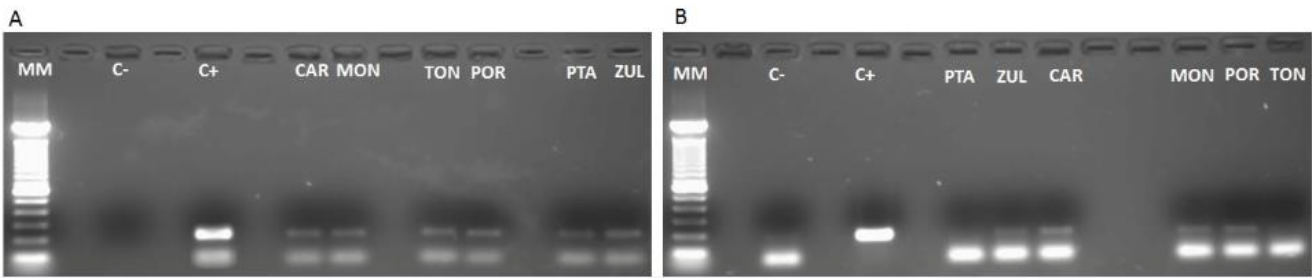


FIG 14