

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 340 121**

21 Número de solicitud: 200801007

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 21/65 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **09.04.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2010**

Fecha de la concesión: **29.03.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **08.04.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 75 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Barcelona (Titular al 25%)

72 Inventor/es: **Blanch Gisbert, Anicet R.;**
García Aljaro, Cristina;
Muñoz Pascual, Francisco Javier y
Muñoz Berbel, Xavier

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento y sistema para detectar y/o cuantificar bacteriófagos, uso de un dispositivo micro-electrónico sensor para detectar dichos bacteriófagos y dispositivo microelectrónico sensor para llevar a cabo dicho procedimiento.**

57 Resumen:

Procedimiento y sistema para detectar y/o cuantificar bacteriófagos, uso de un dispositivo microelectrónico sensor para detectar dichos bacteriófagos y dispositivo microelectrónico sensor para llevar a cabo dicho procedimiento. La presente invención se refiere a un procedimiento y sistema para detectar y/o cuantificar bacteriófagos susceptibles de infectar una cepa huésped bacteriana predeterminada, que está basado en la técnica de la resonancia del plasmón superficial que tiene lugar sobre la superficie de material conductor de un dispositivo sensor óptico, que también se refiere a un dispositivo micro-electrónico sensor para llevar a cabo dicho procedimiento y al uso de dicho dispositivo micro-electrónico sensor para detectar y/o cuantificar dichos bacteriófagos.

ES 2 340 121 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y sistema para detectar y/o cuantificar bacteriófagos, uso de un dispositivo microelectrónico sensor para detectar dichos bacteriófagos y dispositivo microelectrónico sensor para llevar a cabo dicho procedimiento.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y sistema para detectar y/o cuantificar bacteriófagos susceptibles de infectar una cepa huésped bacteriana predeterminada, que está basado en la técnica de la resonancia del plasmón superficial que tiene lugar sobre la superficie de material conductor de un dispositivo sensor óptico.

10 También se refiere a un dispositivo micro-electrónico sensor para llevar a cabo dicho procedimiento y al uso de dicho dispositivo micro-electrónico sensor para detectar y/o cuantificar dichos bacteriófagos.

Antecedentes de la invención

15 Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias, que están formados por ácidos nucleicos (ADN o ARN) envueltos por una cápside proteica. Estos virus presentan una elevada especificidad por las bacterias que infectan de manera que se puede detectar un determinado bacteriófago o grupo de bacteriófagos en función de la cepa huésped seleccionada.

20 De manera resumida, el ciclo de los bacteriófagos consta de 4 fases: en un primer paso se produce el reconocimiento bacteriófago-bacteria y la inyección de los ácidos nucleicos fágicos que contienen la información genética necesaria para la formación de nuevos bacteriófagos. A continuación, el material genético de los bacteriófagos se integra en forma de ADN en el cromosoma bacteriano. Una vez integrado, la infección de la célula huésped puede provocar dos tipos de respuesta en función del tipo de bacteriófago que la infecta. Así, se distinguen los bacteriófagos atemperados, que pueden integrarse en el genoma de la célula huésped indefinidamente o hasta que se induce la lisis por diversos factores, y los bacteriófagos líticos, los cuales tras un periodo de incubación y gracias a la maquinaria biosintética de la célula huésped, replican el material necesario para la creación de nuevos viriones y salen al exterior mediante la lisis de la célula huésped.

30 La detección y/o cuantificación de bacteriófagos de bacterias entéricas resulta de particular importancia en el control microbiológico de aguas y en la determinación del origen de la contaminación fecal. Dichos bacteriófagos han sido propuestos como microorganismos indicadores de la presencia de virus ya que tienen un comportamiento similar a éstos. Existen tres grupos de bacteriófagos de bacterias entéricas que se emplean como indicadores de contaminación fecal de origen vírico: los colífagos somáticos, fagos RNA F-específicos, y fagos que infectan bacterias *Bacteroides* spp.

35 Otro grupo de bacteriófagos cuya detección y/o cuantificación resulta de particular interés, es el formado por los bacteriófagos que infectan bacterias lácticas del tipo de las que se emplean para la producción de quesos u otros productos fermentados de tipo láctico. Dichos bacteriófagos afectan seriamente a la producción de ácido láctico lo que conlleva cuantiosas pérdidas económicas en las industrias lácticas.

40 Los métodos clásicos para la detección de bacteriófagos se basan en la detección de sus efectos sobre sus bacterias huéspedes. Tradicionalmente para la enumeración de los bacteriófagos se utiliza el ensayo de la doble capa de agar, en el que se deposita una capa de agar semi-sólido que contiene una cepa huésped determinada (en función del bacteriófago que se quiera cuantificar) y la muestra a analizar, sobre una capa de agar. La cuantificación de los bacteriófagos se realiza mediante la detección de zonas o placas de lisis originadas por la infección y lisis de la bacteria huésped por un bacteriófago o grupos de bacteriófagos presentes en la muestra, tras un periodo de incubación de dicha cepa huésped.

50 Los métodos basados en la siembra en placas presentan el inconveniente de que son muy lentos, puesto que requieren como mínimo 24 de incubación.

Otros métodos más recientemente descritos para la detección de bacteriófagos se basan en la detección de dichos bacteriófagos mediante la técnica PCR. Sin embargo, estos métodos son caros y, además, muy laboriosos.

55 Las patentes europeas EP0149383 y EP0714450 describen otros métodos para detectar bacteriófagos, en concreto para la detección de bacteriófagos de bacterias lácticas.

60 La patente EP0714450 se refiere a la detección de algún componente interno de la bacteria tras su lisis mediante la emisión de bioluminiscencia, en reacciones enzimáticas catalizadas por enzimas como la luciferaza, mientras que la patente EP0149383, se refiere a la detección de la inhibición del crecimiento mediante el uso de indicadores de pH para detectar la actividad microbiana.

65 Los métodos descritos en las citadas patentes presentan el inconveniente de que no permiten la detección de los bacteriófagos en estado activo, por lo que resultan en la práctica muy poco fiables.

Por otro lado, se trata de métodos muy complejos y caros, puesto que conllevan el uso de un gran número de reactivos.

Descripción de la invención

Un primer objetivo de la presente invención es el de desarrollar un procedimiento y sistema alternativo para detectar y/o cuantificar bacteriófagos, que está basado en el uso de un dispositivo sensor óptico que emplea la técnica de la Resonancia de Plasmón Superficial, en adelante técnica SPR.

De acuerdo con este objetivo, según un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar y/o cuantificar bacteriófagos susceptibles de infectar una cepa huésped bacteriana predeterminada, que comprende las etapas de;

a) adherir bacterias procedentes de por lo menos una de dichas cepas huésped, a la superficie de material conductor de un dispositivo micro-electrónico sensor óptico basado en la técnica de la resonancia de plasmón superficial,

b) exponer las bacterias adheridas a dicha superficie, a una solución del material a analizar susceptible de contener bacteriófagos,

c) incubar la solución procedente de la etapa b) en condiciones predeterminadas al objeto de que, si las bacterias adheridas a la superficie de material conductor del sensor son infectadas por bacteriófagos, se lleve a cabo la lisis de dichas bacterias,

d) medir el ángulo de resonancia de la luz incidente sobre el sensor, mientras se lleva a cabo la incubación de la etapa c), al objeto de detectar el cambio en el ángulo de resonancia producido por la lisis bacteriana.

Atendiendo al mismo objetivo, según un segundo aspecto, la presente invención proporciona un sistema para detectar y/o cuantificar bacteriófagos susceptibles de infectar una cepa huésped bacteriana predeterminada, que comprende un dispositivo micro-electrónico sensor óptico basado en la técnica de la resonancia de plasmón superficial, bacterias de dicha cepa huésped, adheridas a la superficie de material conductor de dicho dispositivo, y medios de procesamiento y control para detectar el cambio en el ángulo de resonancia de la luz incidente sobre el sensor, siendo producido dicho cambio por efecto de la lisis, al ser dichas bacterias infectadas y lisadas por dichos bacteriófagos.

Un segundo objetivo de la presente invención es el de proporcionar un dispositivo micro-electrónico sensor óptico basado en la técnica de la resonancia de plasmón superficial, que comprende bacterias adheridas a la superficie de material conductor del sensor, perteneciendo dichas bacterias a por lo menos una cepa huésped predeterminada, seleccionada para ser infectada por bacteriófagos de especificidad predeterminada a dicha cepa.

Por último, un tercer objetivo de la presente invención es la utilización de un dispositivo micro-electrónico sensor óptico para detectar y/o cuantificar bacteriófagos susceptibles de infectar una cepa huésped bacteriana predeterminada, mediante resonancia de plasmón superficial.

En la presente invención, por dispositivo micro-electrónico se entenderá un componente sensor plano, preferentemente fabricado con tecnologías microelectrónicas de capa delgada.

Por material conductor se entenderá cualquier material conductor, preferentemente, metales, pero también, óxidos conductores dopados.

De igual modo, por técnica de resonancia de plasmón superficial se entenderá la técnica que se basa en la detección del cambio en el índice de refracción que tiene lugar en una solución dispuesta próxima a la superficie de material conductor de un dispositivo sensor óptico.

El fenómeno de la resonancia de plasmón superficial se produce cuando un haz de luz ilumina la interfase entre dos medios con distinto índice de refracción, entre los que se ha insertado una capa fina de material conductor, como por ejemplo, un metal. La onda evanescente creada por la reflexión total interna interacciona con los electrones oscilantes o plasmones del metal, causando una disminución en la intensidad de luz reflejada. El ángulo de resonancia al que se da este fenómeno es sensible al índice de refracción de la solución próxima al metal o material conductor. Como la longitud de onda de la luz incidente y el índice de refracción del metal y del sustrato sobre el que se deposita dicho metal, se mantienen constantes, el ángulo de resonancia varía solamente con los cambios en el índice de refracción de la solución próxima al metal. Por este motivo, en base a éste fenómeno, las interacciones macromoleculares que tienen lugar en la solución próxima al metal o material conductor, pueden monitorizarse mediante los cambios en el ángulo de resonancia.

En la actualidad, los sensores ópticos basados en la técnica SPR, se utilizan para detectar una gran variedad de interacciones biomoleculares, como por ejemplo, interacciones antígeno-anticuerpo. Sin embargo, no se ha descrito el uso de dichos sensores ópticos para la detección de actividad fágica.

La presente invención proporciona un procedimiento y sistema para detectar bacteriófagos que emplea un dispositivo sensor óptico basado en la técnica SPR.

ES 2 340 121 B1

El procedimiento y sistema reivindicado presenta la ventaja de que es muy sencillo, fiable y altamente sensible.

5 Tal y como se ha comentado, el procedimiento y sistema reivindicado está basado en la detección del cambio del índice de refracción, o cambio en el ángulo de resonancia, que tiene lugar en una solución susceptible de contener bacteriófagos, dispuesta próxima a la superficie de material conductor de un dispositivo sensor óptico al que se han adherido bacterias.

10 Los experimentos efectuados han permitido observar que el cambio en el ángulo de resonancia de la luz incidente sobre el sensor óptico tiene su origen en la actividad fágica de los bacteriófagos sobre las bacterias adheridas a la superficie de material conductor del sensor.

15 En concreto, se ha observado que la replicación fágica de los bacteriófagos genera un incremento en el ángulo de resonancia que es debido a la lisis bacteriana, y a la adsorción de los restos de proteínas bacterianas y restos de partículas fágicas, sobre la superficie de material conductor del dispositivo sensor. La lectura del cambio en el ángulo de resonancia que se obtiene mediante la técnica SPR, posibilita la detección y cuantificación de bacteriófagos de la solución de material a analizar.

20 Según una realización preferida, la concentración de bacteriófagos se determina en función del tiempo transcurrido para detectar el cambio en el ángulo de resonancia, mediante la correspondiente curva de calibración que correlaciona el tiempo de detección del cambio con la concentración de bacteriófagos.

25 El sistema y procedimiento de la presente invención presenta la ventaja de que es altamente fiable, puesto que detecta los bacteriófagos en estado activo. Además, se trata de un método muy sensible y rápido que permite detectar hasta 10^2 PFU/ml (Unidades Formadoras de Placas) en menos de 2 horas. Por otro lado, se trata también de un método y sistema muy sencillo, fácilmente reproducible y automatizable, que permite la monitorización en tiempo real de la concentración de bacteriófagos de una muestra. Además, puede aplicarse para la detección de bacteriófagos presentes en cualquier tipo de matriz (aguas residuales, lodos de depuradora, leche, biosólidos, etc...).

30 Tal y como se ha comentado, tanto el sistema como el procedimiento reivindicados requieren de la adhesión a la superficie de material conductor del dispositivo sensor, de la cepa huésped para el bacteriófago o grupo de bacteriófagos que se pretenden detectar. Dicha adhesión bacteriana puede llevarse a cabo mediante técnicas distintas.

35 Según una realización, la adhesión se lleva a cabo mediante la adsorción previa sobre la superficie de material conductor del sensor, de material químico o biológico destinado a inmovilizar las bacterias.

Preferiblemente, dicha adsorción previa se lleva a cabo mediante una solución de avidina destinada a acoplar las bacterias previamente biotiniladas. Sin embargo, según otra realización, dicha adsorción previa se lleva a cabo mediante anticuerpos capaces de reconocer las bacterias a inmovilizar.

40 Según otra realización, la adhesión se realiza mediante la formación de monocapas autoensambladas (SAMs) sobre la superficie de material conductor del sensor, en las que se inmoviliza la avidina de manera específica. Para la formación de las monocapas autoensambladas se utiliza preferentemente compuestos tiolados con grupos funcionales epoxi o aldehído.

45 En cualquier caso, la presente invención proporciona un dispositivo micro-electrónico sensor para detectar bacteriófagos que constituye, por sí mismo, una valiosa herramienta de diagnóstico que permite la monitorización en tiempo real de la lisis bacteriana, sin necesidad de utilizar reactivos marcados.

50 Preferiblemente, dicho dispositivo micro-electrónico es un chip sensor o dispositivo micro-electrónico miniaturizado plano, preferentemente fabricado con tecnologías litográficas de capa delgada. El chip constituye un sensor muy sensible, el cual, gracias a su reducido tamaño, permite realizar medidas en volúmenes de muestra muy pequeños y en tiempos muy cortos.

55 También preferiblemente, el material conductor de dicho dispositivo micro-electrónico es oro. Sin embargo, tal y como se ha comentado, pueden emplearse también otros metales, como por ejemplo, plata.

60 El procedimiento y sistema reivindicados pueden aplicarse a la detección de cualquier tipo de bacteriófagos siempre que se disponga de la cepa huésped para la que dicho bacteriófago presenta una especificidad predeterminada. Dichos bacteriófagos pueden proceder de muestras de materiales muy diversos; por ejemplo de aguas, lodos de depuradoras, leche, u otro tipo de materiales sólidos o líquidos para los que la detección de bacteriófagos resulte interesante.

65 En el caso concreto de muestras procedentes de aguas, la detección de bacteriófagos resulta especialmente interesante, puesto que éstos han sido propuestos como microorganismos indicadores de la presencia de contaminación fecal de tipo vírico.

Según una realización preferida, la presente invención se refiere a la detección de bacteriófagos de importancia en el control microbiológico de aguas y/o en la determinación de contaminación fecal, entre los que se incluyen,

ES 2 340 121 B1

por ejemplo, los colífagos somáticos, los bacteriófagos F-RNA específicos, y bacteriófagos que infectan *Bacteroides fragilis*.

Según otras realizaciones, los bacteriófagos de la presente invención son bacteriófagos que infectan bacterias lácticas, como por ejemplo: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, y *Streptococcus thermophilus*.

Breve descripción de los dibujos

Para mayor comprensión de cuanto se ha expuesto se acompañan unos dibujos en los que, esquemáticamente y sólo a título de ejemplo no limitativo, se representa un caso práctico de realización para la detección y cuantificación de colífagos somáticos presentes en muestras procedentes de aguas residuales.

En dichos dibujos:

la figura 1 es una vista esquemática de la estructura de un dispositivo micro-electrónico sensor, en concreto, un chip sensor óptico, empleado para detectar bacteriófagos mediante la técnica de resonancia de plasmón superficial,

la figura 2 muestra una representación gráfica en el tiempo de medidas del ángulo de resonancia tomadas en una muestra control y en una muestra de agua residual que contiene el colífago somático $\Phi X174$ susceptible de infectar la cepa bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 700078,

la figura 3 muestra una representación gráfica en el tiempo de medidas normalizadas del ángulo de resonancia tomadas en una serie de disoluciones que contienen distintas concentraciones del colífago somático $\Phi X174$. Las medidas representadas son las tomadas durante la fase de incubación de las disoluciones, en la que se produce el incremento del ángulo de resonancia debido a la lisis y

la figura 4 es una representación gráfica que muestra las medidas normalizadas del ángulo de resonancia de tres muestras de agua residual analizadas, de referencia GA2007, HM1402 y HM2100. Las medidas representadas son las tomadas durante la fase de incubación de las muestras, en la que se produce el incremento del ángulo de resonancia debido a la lisis.

Descripción de una realización preferida

A continuación se describe un ejemplo de realización del procedimiento y sistema de la presente invención para la detección del bacteriófago $\Phi X174$ que infecta la cepa huésped de *Escherichia coli* ATCC 700078, también conocida como cepa WG5 según descrito en la norma internacional ISO 10705-2.

En la realización que se describe, el dispositivo micro-electrónico empleado es un chip sensor óptico 1 como el representado en la figura 1, que comprende una capa 1a de oro de 50 nm, depositado sobre un sustrato de sílice 1b.

Tal y como se ha comentado en la descripción detallada de la invención, el procedimiento y sistema reivindicados están basados en el fenómeno de resonancia de plasmón superficial que tiene lugar en un chip sensor 1, al que previamente se han adherido bacterias 2 de una cepa huésped predeterminada para el bacteriófago o grupo de bacteriófagos que se pretende detectar.

En la realización que se describe, las bacterias 2 son adheridas a la superficie 1a de oro del chip 1 mediante uniones avidina-biotina. Para ello, en primer lugar se realiza una funcionalización de la superficie de oro del chip 1 mediante la adsorción directa de 50 μ l de una solución de avidina (0,5 mg/ml), durante 10 minutos. A continuación, se lava la superficie 1a del chip 1 con tampón fosfato y se procede a la inmovilización bacteriana propiamente dicha de las bacterias 2 previamente biotiniladas según procesos estándares.

Para llevar a cabo la inmovilización de la cepa bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 700078 sobre la superficie activa del chip 1, se procede a incubar las bacterias 2 biotiniladas durante 1 hora y a 37°C, en tampón fosfato. La incubación posibilita el acoplamiento de las bacterias 2 con la avidina adsorbida y, por lo tanto, la adhesión de dichas bacterias 2 mediante uniones avidina-biotina, a la superficie 1a del chip 1.

Una vez adheridas las bacterias 2 a la superficie 1a del chip, se lleva a cabo la detección de bacteriófagos propiamente dicha. Para ello, el chip 1, en particular la superficie metálica 1a sobre la que se encuentran adheridas las bacterias 2, se expone a un medio de cultivo para el enriquecimiento de los bacteriófagos, en el que previamente se inocula una muestra de la solución de material a analizar. A continuación, se procede a incubar la solución en contacto con el chip 1 hasta la detección de la señal de resonancia.

Una vez realizado todo el proceso de detección, el chip 1 empleado se lava con etanol y agua, y es sometido a un tratamiento de ozonización de treinta minutos antes de volver a ser reutilizado.

En el ejemplo de realización que se describe, se analizaron tres muestras diferentes de aguas residuales de origen urbano que contenían concentraciones distintas de bacteriófagos colífagos somáticos $\Phi X174$. Para preparar las mues-

ES 2 340 121 B1

tras, en cada caso se procedió a inocular 10 μ l de la muestra correspondiente en 90 μ l de medio de cultivo MSB para el enriquecimiento de los colifagos somáticos. El medio de cultivo MSB empleado para el enriquecimiento de colifagos somáticos se preparó según lo descrito en la norma internacional ISO 10705-2.

5 El procesado de las muestras, antes de su inóculo, consistió en una centrifugación de 10 minutos a 1000 r.p.m., y en una filtración en filtro de 0,22 μ m de baja adsorción proteica.

Las medidas del ángulo de resonancia se efectuaron mientras se llevaba a cabo la incubación a 37°C de la solución de material a analizar en contacto con el chip 1, al objeto de que si las bacterias 2 eran infectadas por bacteriófagos, fuera detectado el cambio en el ángulo de resonancia producido por la lisis bacteriana.

La lectura del cambio en el ángulo de resonancia producido por dicha lisis se lleva a cabo mediante un equipo comercial SPR que analiza, por medio de un detector de diodos, la intensidad de la luz reflejada por el sensor 1 óptico.

15 Para la lectura del ángulo de resonancia, el chip sensor 1, en el que tiene lugar el fenómeno de resonancia, se dispone en contacto con un prisma 3 de acoplamiento de un sistema óptico a través del que se enfoca la luz polarizada hacia el plano no modificado del chip sensor 1, en este caso, el plano de sílice 1b. La luz incidente polarizada se acopla al campo de electrones a través de dicho prisma 3 para crear una onda energética que se extiende a través del material dieléctrico depositado en la superficie 1a del chip 1 (en la realización que se describe, medio de cultivo MSB inoculado con la solución de material a analizar). La interacción de la onda evanescente con los electrones oscilantes o plasmones de material conductor, causa una disminución de la intensidad de la luz reflejada que es detectada y analizada por el equipo comercial SPR. El ángulo de resonancia al que se da el fenómeno descrito es sensible al índice de refracción de la solución próxima al metal 1a, por lo que los cambios en el índice de refracción de dicha solución pueden monitorizarse mediante la lectura del ángulo de resonancia.

En la presente invención, los experimentos efectuados han permitido observar que la replicación fágica de los colifagos somáticos presentes en la solución de material a analizar, modifica el índice de refracción de la solución próxima al metal 1a del sensor 1, lo que se traduce en un incremento en el ángulo de resonancia de la luz incidente. Este incremento se ha atribuido a la lisis bacteriana y a la adsorción de los restos de proteínas bacterianas y restos de partículas fágicas sobre la superficie 1a de material conductor del sensor 1.

La figura 2 muestra una representación gráfica en el tiempo de las medidas del ángulo de resonancia tomadas en una muestra control y en una de las muestras de agua residual analizadas, que contiene colifagos somáticos Φ X174. La representación gráfica incluye medidas del ángulo durante la fase de funcionalización del chip 1, la fase de inmovilización bacteriana, y la fase de detección propiamente dicha de los bacteriófagos, en la que se incuba la solución de material a analizar en contacto con el chip 1.

Tal y como se aprecia en la figura 2, la muestra que contiene bacteriófagos presenta un incremento en el ángulo de resonancia de alrededor de 150 miligrados en un tiempo de detección no superior a dos horas (el punto de incremento de la lectura del ángulo de resonancia viene representado mediante un asterisco). Este hecho se atribuye a la actividad de los bacteriófagos.

Para calibrar el sensor 1, se comparó en paralelo la cantidad de bacteriófagos detectados mediante el ensayo tradicional de la doble capa de agar, descrito en la ISO 10705-2, con la detección de los mismos mediante el método de la invención que utiliza la técnica SPR.

Para ello, se preparó un stock del bacteriófago Φ X174, de 10^{10} PFU/ml (Unidades Formadoras de Placas) y se realizaron diluciones decimales seriadas en tampón fosfato, las cuales fueron valoradas en paralelo mediante las dos técnicas mencionadas.

La figura 3 muestra una representación gráfica en el tiempo de medidas normalizadas del ángulo de resonancia para la serie de disoluciones mencionadas. Las medidas representadas son las tomadas durante la fase de incubación de dichas disoluciones, en la que tiene lugar el incremento del ángulo de resonancia producido por la actividad fágica.

Tal y como se observa en la figura 3, la pendiente de las curvas de calibración representadas es más pronunciada para aquellas disoluciones con una concentración mayor de bacteriófagos, siendo el tiempo de detección del cambio en el ángulo de resonancia, menor, cuanto más alta es dicha concentración.

Los experimentos efectuados han puesto de manifiesto que el límite de detección del método puede establecerse en 10^2 PFU/ml (Unidades Formadoras de Placas), produciéndose un aumento del ángulo de resonancia en un tiempo no superior a 2 h, en todos los casos.

En la figura 4, se han representado las medidas normalizadas del ángulo de resonancia de las tres muestras de agua residual analizadas, de referencia GA2007, HM1402 y HM2100. Las medidas representadas son las tomadas durante la fase de incubación de las muestras, en la que se produce el incremento del ángulo de resonancia debido a la lisis.

ES 2 340 121 B1

Tal y como puede apreciarse en la figura 4, la pendiente de la curva normalizada es superior para la muestra de referencia GA2007, lo que indica que la concentración de bacteriófagos de dicha muestra es superior a la de las otras muestras, siendo detectado el cambio en el ángulo de resonancia en un tiempo inferior.

5 El cálculo de la concentración de bacteriófagos de cada una de las muestras de la figura 4, se determina en función del tiempo transcurrido para la detección del cambio en el ángulo de resonancia, mediante la correspondiente curva de calibración que correlaciona el tiempo de detección del cambio con la concentración de bacteriófagos.

10 Sorprendentemente, la presente invención proporciona un sistema y método para detectar bacteriófagos que es muy sensible y, además, muy fiable, puesto que se ha demostrado que los resultados obtenidos con el método SPR presentan una elevada correlación con los resultados obtenidos mediante el ensayo tradicional de doble capa de agar.

15 En la realización que se describe, la adhesión de bacterias 2 a la superficie del chip 1 se ha llevado a cabo mediante la adsorción de una solución de avidina a la que se acoplan las bacterias 2 previamente biotiniladas. No obstante, tal y como ya se ha comentado en la descripción de la invención, la adhesión de bacterias puede realizarse mediante cualquier otro tipo de técnica equivalente destinada a inmovilizar las bacterias 2 sobre la superficie de material conductor 1a del chip sensor 1.

20 Por otro lado, la realización descrita se refiere a la detección de bacteriófagos colífagos somáticos que infectan *Escherichia coli*. No obstante, tal y como ya se ha comentado, la presente invención puede aplicarse a la detección y/o cuantificación de cualquier tipo de bacteriófago siempre que se disponga de una cepa huésped bacteriana susceptible de ser infectada por dicho bacteriófago.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 340 121 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para detectar y/o cuantificar bacteriófagos susceptibles de infectar una cepa huésped bacteriana predeterminada, que comprende las etapas de;
- a) adherir bacterias procedentes de por lo menos una de dichas cepas huésped, a la superficie de material conductor (1a) de un dispositivo micro-electrónico sensor óptico (1) basado en la técnica de la resonancia de plasmón superficial,
- 10 b) exponer las bacterias (2) adheridas a dicha superficie, a una solución del material a analizar susceptible de contener bacteriófagos,
- c) incubar la solución de la etapa b) en condiciones predeterminadas al objeto de que, si las bacterias (2) adheridas sobre la superficie de material conductor (1a) son infectadas por bacteriófagos, se lleve a cabo la lisis de dichas bacterias (2),
- 15 d) medir el ángulo de resonancia de la luz incidente sobre el sensor (1), mientras se lleva a cabo la incubación de la etapa c), al objeto de detectar el cambio en el ángulo de resonancia producido por la lisis bacteriana.
- 20 e) determinar la concentración de bacteriófagos de la solución, en función del tiempo transcurrido para detectar el cambio en el ángulo de resonancia, mediante la correspondiente curva de calibración que correlaciona el tiempo de detección del cambio con la concentración de bacteriófagos.
- 25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la adhesión bacteriana de la etapa a) comprende la adsorción previa sobre dicha superficie de material conductor (1a), de material químico o biológico destinado a inmovilizar las bacterias (2) sobre el sensor (1).
3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el material conductor (1a) es oro.
- 30 4. Procedimiento según la reivindicación 1 donde las bacterias (2) son bacterias biotinizadas.
5. Procedimiento según la reivindicación 1 donde dichos bacteriófagos son colífagos somáticos o bacteriófagos susceptibles de infectar cepas de *Escherichia coli*.
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 1 donde dichos bacteriófagos son bacteriófagos susceptibles de infectar cepas de bacterias lácticas.
7. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la solución de material a analizar procede de una muestra de material líquido o material solubilizado en un líquido.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la solución de material a analizar procede de una muestra de agua.
- 45 9. Sistema para detectar y/o cuantificar bacteriófagos susceptibles de infectar una cepa huésped bacteriana predeterminada, que comprende un dispositivo micro-electrónico sensor (1) óptico basado en la técnica de la resonancia de plasmón superficial, bacterias (2) de dicha cepa huésped, adheridas a la superficie de material conductor (1a) de dicho dispositivo (1), y medios de procesamiento y control para detectar el cambio en el ángulo de resonancia de la luz incidente sobre el sensor (1), siendo producido dicho cambio por efecto de la lisis, al ser dichas bacterias (2) infectadas y lisadas por dichos bacteriófagos.
- 50 10. Sistema según la reivindicación 9 donde el material conductor (1a) es oro.
11. Sistema según la reivindicación 9 donde las bacterias (2) son bacterias biotinizadas.
- 55 12. Sistema la reivindicación 9 donde dichos bacteriófagos son colífagos somáticos o bacteriófagos susceptibles de infectar cepas de *Escherichia coli*.
13. Sistema según la reivindicación 9 donde dichos bacteriófagos son bacteriófagos susceptibles de infectar cepas de bacterias lácticas.
- 60 14. Sistema según la reivindicación 9 en el que la solución de material a analizar procede de una muestra de material líquido o material solubilizado en un líquido.
- 65 15. Sistema según la reivindicación 9 en el que la solución de material a analizar procede de una muestra de agua.
16. Dispositivo micro-electrónico sensor óptico basado en la técnica de la resonancia de plasmón superficial, que comprende bacterias (2) adheridas a la superficie de material conductor (1a) del sensor (1), perteneciendo dichas

ES 2 340 121 B1

bacterias (2) a por lo menos una cepa huésped predeterminada, seleccionada para ser infectada por bacteriófagos específicos para dicha cepa.

- 5
17. Dispositivo según la reivindicación 16 donde el material conductor (1a) es oro.
18. Dispositivo según la reivindicación 16 donde las bacterias (2) son bacterias biotiniladas.
19. Dispositivo según la reivindicación 16 donde dichos bacteriófagos son colífagos somáticos o bacteriófagos susceptibles de infectar cepas de *Escherichia coli*.
- 10
20. Dispositivo según la reivindicación 16 donde dichos bacteriófagos son bacteriófagos susceptibles de infectar cepas de bacterias lácticas.
21. Dispositivo según la reivindicación 16 en el que la solución de material a analizar procede de una muestra de material líquido o material solubilizado en un líquido.
- 15
22. Dispositivo según la reivindicación 16 en el que la solución de material a analizar procede de una muestra de agua.
- 20
23. Uso de un dispositivo micro-electrónico sensor óptico para detectar y/o cuantificar bacteriófagos susceptibles de infectar una cepa huésped bacteriana predeterminada según la reivindicación 16, mediante resonancia de plasmón superficial.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

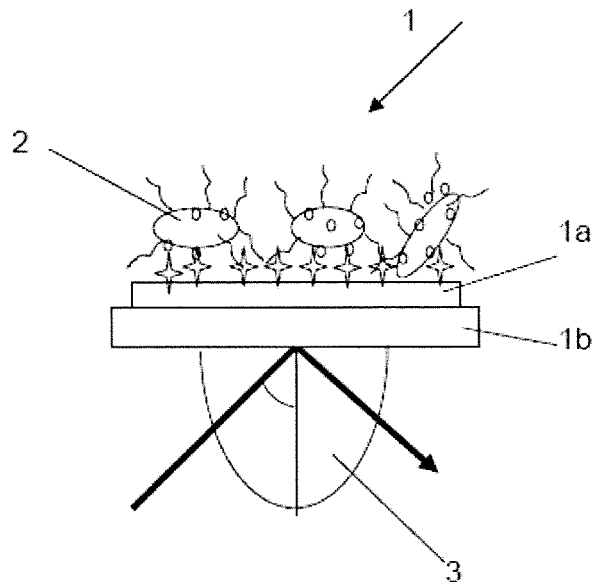


FIG. 1

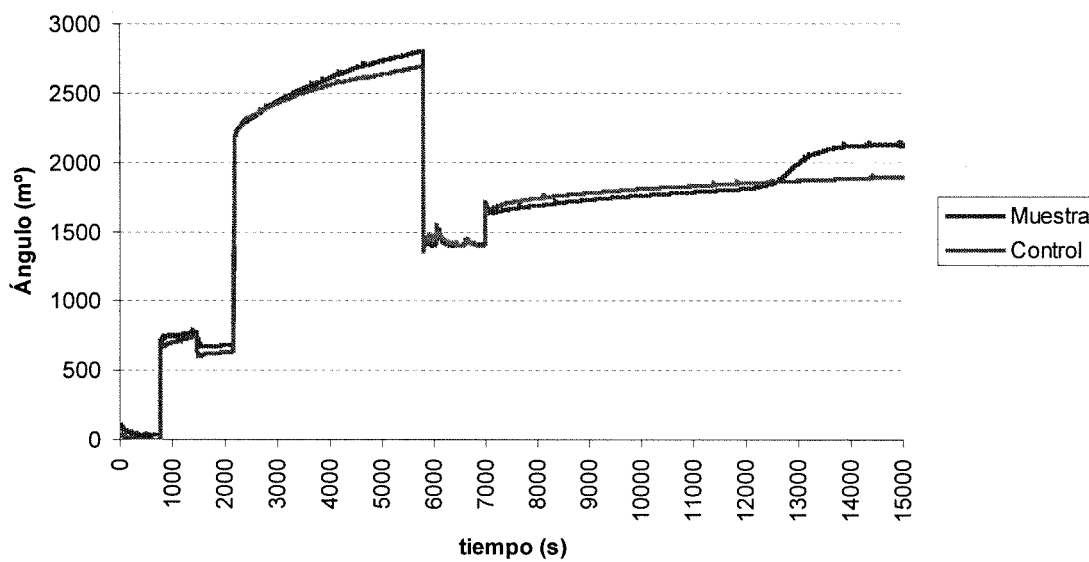


FIG. 2

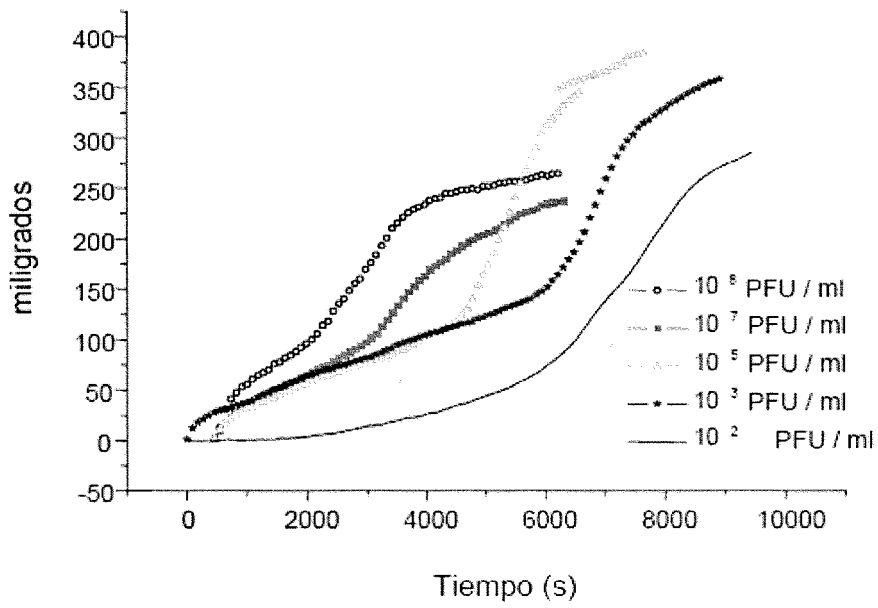


FIG. 3

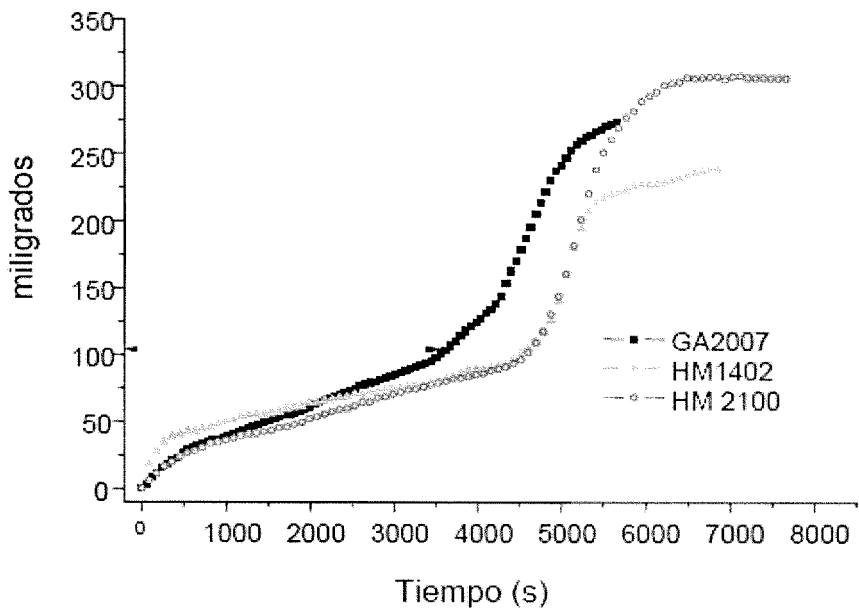


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 121

② N° de solicitud: 200801007

③ Fecha de presentación de la solicitud: 09.04.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MUÑOZ-BERBEL, X. et al. Impedimetric approach for monitoring the formation of biofilms on metallic surfaces and the subsequent application to the detection of bacteriophages. <i>Electrochemical Acta</i> . 01.08.2008. [disponible en línea 29.03.2008] Vol 53. N° 19, páginas 5739-5744, ISSN 0013-4686 112 [en línea], [recuperado el 13.07.2009]. Recuperado de Internet <URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TG0-4S5FJGY-7&_user=6409497&_coverDate=08%2F01%2F2008&_rdoc=5&_fmt=high&_orig=browse&_srch=doc-info(%23toc%235240%232008%23999469980%23689518%23FLA%23display%23Volume)&_cdi=5240&_sort=d&_docanchor=&view=c&_ct=21&_acct=C000069789&_version=1&_urlVersion=0&_userid=6409497&md5=4db99b87425b1d9a46be737b849a86df > <DOI: 10.1016/j.electacta.2008.03.050>	1-23
Y	BALASUBRAMANIAN, S. et al. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of <i>Staphylococcus aureus</i> -A surface plasmon resonance spectroscopic study. <i>Biosensors & Bioelectronics</i> . 2007. Vol. 22. N° 6, páginas 948-955, ISSN 0956-5663, <DOI: 10.1016/j.bios.2006.04.003>	1-23
A	GERVAIS, L. et al. Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces. <i>Sensors and Actuators B: Chemical</i> . 2007. Vol. 125. N° 2, páginas 615-621. ISSN 0925-4005 (impreso) <DOI: 10.1016/j.snb.2007.03.007>	2,4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

11.05.2010

Examinador

A. Figuera González

Página

1/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 21/65 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTEN, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, XPESP, internet

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.05.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 23	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1 - 23	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MUÑOZ-BERBEL, X. et al. Impedimetric approach for monitoring the formation of biofilms on metallic surfaces and the subsequent application to the detection of bacteriophages. <i>Electrochemical Acta</i> . 01.08.2008. [disponible en línea 29.03.2008] Vol 53. N° 19, páginas 5739- 5744	29-03-2008
D02	BALASUBRAMANIAN, S. et al. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of <i>Staphylococcus aureus</i> -A surface plasmon resonance spectroscopic study. <i>Biosensors & Bioelectronics</i> . 2007. Vol. 22. N°6, páginas 948 - 955	2007
D03	GERVAIS, L. et al. Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces. <i>Sensors and Actuators B: Chemical</i> . 2007. Vol. 125. N° 2, páginas 615 - 621	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

REIVINDICACIÓN 1.

En el documento D01 se describe un método para la detección de bacteriófagos. El problema técnico que se plantea en el documento D01 es el mismo que el que se plantea en la solicitud de patente: se trata de encontrar un método alternativo a los métodos tradicionales de detección de bacteriófagos basados en el ensayo de la doble capa de agar. Se pretende que el nuevo método permita una detección rápida, lo más cercana posible a una detección en tiempo real, de la concentración de bacteriófagos en una muestra. Ver solicitud de patente página 3, línea 21 a página 3, línea 22 y documento D01, página 5739, columna de la derecha.

La solución propuesta en el caso del documento D01 consiste en relacionar la degradación de bio-películas de bacterias adheridas a la superficie de un electrodo microfabricado en presencia de una muestra que contenga bacteriófagos con la concentración de bacteriófagos en dicha muestra. Ver documento D01, página 5739, columna de la derecha, últimas 3 líneas a página 5740 apartado 2.6 y página 5743, columna de la derecha a página 5744, columna de la derecha.

Así pues, se puede considerar que el método del documento D01 es un "procedimiento para detectar y/o cuantificar bacteriófagos susceptibles de infectar una cepa huésped bacteriana predeterminada que comprende las etapas de:

- a) adherir bacterias procedentes de por lo menos una de dichas cepas huésped a la superficie de material conductor de un dispositivo micro-electrónico sensor basado en una técnica de medida
- b) exponer las bacterias adheridas a dicha superficie a una solución de material a analizar susceptible de contener bacteriófagos
- c) incubar la solución de la etapa b) en condiciones predeterminadas al objeto de que, si las bacterias adheridas sobre la superficie del material conductor son infectadas por bacteriófagos, se lleva a cabo la lisis de dichas bacterias
- d) medir un parámetro mientras se lleva a cabo la incubación de la etapa c) al objeto de detectar el cambio en dicho parámetro producido por la lisis bacteriana.
- e) determinar la concentración de bacteriófagos de la solución mediante las correspondientes curvas de calibración"

Como se puede apreciar, la única diferencia entre el método del documento D01 y el método objeto de la reivindicación 1 es que en el caso del método del documento D01 la técnica de medida y el parámetro medido son diferentes: el microsensor del documento D01 es un microsensor eléctrico basado en la medida de impedancias y el parámetro medido es la capacitancia del biofilm.

Hoja adicional

Sin embargo es conocido en el mismo sector de la técnica el uso de un microsensar óptico basado en la resonancia de plasmón superficial y la medida del ángulo de la luz incidente sobre el microsensar para determinar los cambios sufridos por una bio-película adherida a un micro-electrodo.

En efecto, en el documento D02 se describe un método para detectar la concentración de una bacteria (*Staphylococcus aureus*) utilizando como sonda específica y selectiva un fago lítico mediante resonancia del plasmón superficial.

En el documento D02 se explica en qué consiste la resonancia del plasmón superficial y se indica la relación entre el índice de refracción RI y el ángulo de resonancia. Ver documento D02, página 949, columna de la izquierda, tercer párrafo.

El procedimiento del documento D02 comprende la inmovilización de un fago en una superficie de oro por adsorción física. Ver documento D02, página 951, apartado 3.1. Phage immobilization. A continuación se introducen muestras con diferentes concentraciones de bacterias en el equipo y se observa que al adherirse las bacterias a los fagos se produce un cambio en el índice de refracción RI que se puede relacionar con la concentración de bacterias. En el documento D02 se indica como relacionar la concentración de bacterias en la muestra con la variación del índice de refracción en función del tiempo y se indica como construir las curvas de calibración. Ver documento D02, páginas 951 y siguientes, apartado 3.2. Bacterial detection.

Por lo tanto, para el experto en la materia sería evidente utilizar la técnica de detección del documento D02 en el procedimiento del documento D01 puesto que se trata de una alternativa conocida, cuya aplicación al caso del documento D01 no plantea aparentemente ningún problema técnico y de la cual no se reivindica ninguna característica técnica concreta que sea necesaria para su aplicación al método del documento D01.

En conclusión, el objeto de la reivindicación 1 no implica actividad inventiva de acuerdo con el artículo 8 de la Ley de Patentes.

REIVINDICACIONES 2 y 4.

El mejorar la adhesión a la superficie de un electrodo de material conductor de microorganismos utilizando la química de la avidina-biotina es una técnica conocida que se menciona en el propio documento D02, página 951, apartado 3.1 Phage immobilization, primera frase.

Esta técnica se ilustra más en detalle en el documento D03 que pertenece al mismo campo de la técnica que el documento D02 ya que también trata de la determinación de la concentración de bacterias en una muestra mediante el uso de un biosensar con un micro-electrodo sobre el cual se encuentran adheridos fagos.

Los fagos biotinilados se inmovilizan sobre la superficie del sensor al que previamente se ha unido una capa de streptavidina. Ver documento D03, página 616, figura 1 (b) y (c)

En definitiva, las reivindicaciones 2 y 4 que dependen de la reivindicación 1 que carece de actividad inventiva no añaden ninguna característica técnica adicional que no sea obvia para el experto en la materia, y por lo tanto carecen a su vez de actividad inventiva.

REIVINDICACIONES 3 y 5 a 8.

Tanto en el documento D01 (ver D01, página 5740, apartado 2.2. Electrochemical cell) como en el documento D02 (ver D02, página 950, apartado 2.5. Phage immobilization) se utiliza una superficie conductora de oro. En el documento D01 se menciona la aplicación del método descrito a la detección de colifagos somáticos (ver página 5740, apartado 2.7 Bacteriophage enumeration and preparation of stock cultures). También se menciona el interés del método para la detección de bacteriófagos que puedan causar daños económicos en las industrias de la fermentación como pueden ser las industrias productoras de lácteos fermentados tales como quesos y yogures (ver documento D01, página 5739, columna de la derecha). El método se emplea para el análisis de muestras de agua procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (ver documento D01, página 5740, apartado 2.6 Sewage samples collection and processing).

En definitiva las reivindicaciones 3 y 5 a 8, dependientes de la reivindicación 1 que carece de actividad inventiva, no aportan ninguna característica nueva adicional y por lo tanto carecen a su vez de actividad inventiva.

Hoja adicional

REIVINDICACIONES 9 a 15 y 16 a 22.

Por un razonamiento análogo al expuesto anteriormente sobre la falta de actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 8, las reivindicaciones 9 a 15 que se refieren a un sistema y las reivindicaciones 16 a 22 que se refieren a un dispositivo y que están basadas en las mismas características técnicas en que se basa el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 8, carecen a su vez de actividad inventiva.

REIVINDICACIÓN 23.

La reivindicación 23 se refiera al uso del dispositivo de la reivindicación 16 sin añadir ninguna característica técnica adicional.

Así pues la reivindicación 23, que se considera independiente pero que hace referencia a la reivindicación 16 carente de actividad inventiva, carece a su vez de actividad inventiva.