

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 580**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07731707 .1**

96 Fecha de presentación: **08.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1994167**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **MÉTODO PARA LEER IMÁGENES, EN PARTICULAR PARA ESTUDIAR EL DESARROLLO DE UNA BIOPELÍCULA EN UN MEDIO DE CULTIVO.**

30 Prioridad:
10.03.2006 FR 0602145

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.02.2012

73 Titular/es:
**BIOFILM CONTROL
BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE
63360 SAINT BEAUZIRE, FR**

72 Inventor/es:
**BERNARDI, Thierry y
BARA, Nicolas**

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 373 580 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para leer imágenes, en particular para estudiar el desarrollo de una biopelícula en un medio de cultivo.

- 5 **[0001]** La invención se refiere al campo del estudio del comportamiento de cultivos de microorganismos.
- [0002]** La presente invención más particularmente, pero no exclusivamente, se refiere al campo del estudio del desarrollo de una biopelícula en un medio de cultivo homogéneo o no homogéneo.
- 10 **[0003]** La expresión “medio de cultivo” significa cualquier medio donde al menos un microorganismo es susceptible de estar presente y desarrollarse. Así, es un medio que puede ser natural o sintético. En consecuencia, el agua cae dentro de esta definición, por ejemplo. “Medio de cultivo” por lo tanto significa, de acuerdo a la invención, el microorganismo y el medio en donde puede ser encontrado, o posiblemente sólo el medio.
- 15 **[0004]** Las biopelículas están formadas de varias capas de bacterias o microorganismos, contenidos en una matriz sólida. Se desarrollan para formar comunidades microbianas, una de las propiedades de la cual consiste en adherirse a las superficies sumergidas, Tal adhesión es o no específica (adherencia), o específica (adhesión propiamente) (Consterlon y otros. *Bacterial Biofilms*, Sciencies 1999; 284-6):
- 20 - Adherencia o adhesión reversible: Los microorganismos existentes se acercan a las superficies por gravitación, movimientos Brownianos o quimiotactismo si tienen flagelos. Durante el primer paso de fijación que exige sólo dos fenómenos puramente físicos e interacciones fisicoquímicas débiles, los microorganismos pueden ser todavía fácilmente separados.
- 25 - Adhesión: Este paso más lento exige interacciones más fuertes así como el metabolismo microbiano y los apéndices celulares del microorganismo (flagelos, pilis,...). La adhesión es un fenómeno activo y específico. Algunos de los primeros pioneros se van a fijar de una forma irreversible a la superficie más particularmente gracias a la síntesis de exopolisacáridos (EPS). Este proceso es relativamente lento y depende de los factores medioambientales presentes y los microorganismos.
- 30 **[0005]** Tales biopelículas se pueden encontrar en todas partes en numerosos campos, en donde acarrear riesgos para la salud y pueden causar daños relativamente importantes.
- 35 **[0006]** En lo que respecta a la salud de los seres humanos por ejemplo, las biopelículas son responsables de infecciones que son cada vez más difíciles de contener: en el área completa nariz-oído-garganta (canal auditivo, membrana mucosa de la nariz y el seno, conjuntiva ocular...), en los dientes (aparición de sarro, caries,...), en los bronquios, pulmones (en pacientes que sufren de mucoviscidosis...), al nivel del tracto urinario genital, etc. Adicionalmente, son el origen de la mayoría de las patologías nosocomiales (más de 10.000 defunciones por año) formándose al nivel de catéteres o implantes (válvulas cardíacas, caderas artificiales, catéteres urinarios...) (J.W. Costerton, P. Stewart y E.P. Greenberg, *Bacterial Biofilms: “A common cause of persistent infections”*. Science, volume 284, páginas 1318-1322).
- 40 **[0007]** Las biopelículas también conciernen a la industria agrícola y alimenticia en cuanto a su implicación en el envenenamiento de comida (formación en la rotura de la cadena de frío, desarrollo en herramientas cortantes, herramientas abrasivas, o en las mesas de trabajo). También están presentes en las torres de refrigeración y son responsables de infecciones por legionella.
- 45 **[0008]** El desarrollo y comportamiento de tales biopelículas permanece pobremente conocido sin embargo ya que su estudio es complicado, a pesar de que se han implementado muchos métodos para estudiar el desarrollo de las biopelículas.
- 50 **[0009]** Entre los métodos implementados para estudiar el comportamiento de tales comunidades microbianas, se conoce el descrito en la solicitud de patente internacional WO2005/090944. El método descrito en esta solicitud de patente se basa en el modelado del desarrollo de biopelículas en un medio no homogéneo, turbio y opaco correspondiente al medio de cultivo en donde los microorganismos se desarrollan para formas tales biopelículas. Dicho modelado es realizado de la medición de la viscosidad del medio de cultivo. El concepto de viscosidad sólo describe parcialmente el efecto de la biopelícula. De hecho, la biopelícula está compuesta de:
- 55 - por un lado, una cierta cantidad de exopolisacáridos (EPS), o cualquier otra sustancia viscosa, producida por microorganismos.
- 60 - por otro lado, a través de una red, un entramado de fibras y cuerpos celulares. De hecho, los microorganismos usan los apéndices celulares de los microorganismos (flagelos, pilis,...) para adherirse a las superficies.
- 65 **[0010]** La medida más específicamente corresponde a la medida de viscosidad y a una medida de la resistencia a la tracción en los apéndices celulares. De hecho, la medición usa partículas magnetizables, magnéticas o

eléctricamente cargadas (o bolas) (que pueden ser magnetizadas o cargadas eléctricamente bajo el efecto de un campo magnético, electromagnético o eléctrico), o cubiertas con al menos una capa electromagnética o magnetizable. En el texto siguiente el término “magnético” será usado para referirse a la expresión “cargado eléctricamente” o a los términos “magnético” o “magnetizable” o a la expresión “cubierto con al menos una capa magnética o magnetizable”, indiferentemente. Tales partículas que existen en la superficie donde la biopelícula se va a desarrollar serán atrapadas por la sustancia viscosa liberada por los microorganismos y por los apéndices celulares usados por los microorganismos. Las partículas son inmovilizadas por los dos factores, en proporciones /tasas variables dependiendo de los microorganismos estudiados.

10 **[0011]** Así, el método descrito en la solicitud anteriormente mencionada consiste en:

- 15 a) sumergir al menos una partícula magnética en un medio de cultivo. El medio de cultivo está preferiblemente posicionado en uno o varios pocillos de una microplaca.
 b) someter el medio de cultivo a un campo magnético, eléctrico o electromagnético, de tal forma que se mueve la partícula.
 c) detectar el grado de libertad de movimiento de la mencionada partícula en el mencionado cultivo.

20 **[0012]** El grado de movilidad de las partículas se reduce o se anula si aumenta la viscosidad, además de la producción de EPS por el microorganismo, o si el microorganismo desarrolla apéndices celulares (flagelos, pilis...) para adherirse a una superficie, atrapando así las partículas al mismo tiempo.

25 **[0013]** Este último paso c) es realizado preferiblemente por medio de una medición óptica. Se trata de la iluminación de la base de los pocillos en la microplaca usando una fuente de luz, para iluminar la(s) partícula(s) magnética(s), y así determinar el movimiento de la(s) partícula(s) en el medio de cultivo, comparando imágenes. Tal comparación es realizada, por un lado, antes y después del efecto de un campo magnético, eléctrico o electromagnético, y por otro lado, a intervalos de tiempo dados (un tiempo para que el microorganismo desarrolle y forme una biopelícula o no).

30 **[0014]** Los dispositivos de detección óptica usados son dispositivos de imagen convencionales (escáner, cámara de fotos o cámara de video). Las vistas corresponden a la base del pocillo, vistas desde abajo, por transparencia. El camino óptico convencional sucesivamente pasa a través de los siguientes elementos:

- 35 - base externa del pocillo,
 - materiales que componen la base del pocillo (transparente, plástico, cristal...),
 - base interna del pocillo,
 - medio de cultivo,
 - menisco del medio de cultivo,
 - aire sobre el medio de cultivo.

40 **[0015]** Cualquiera que sea el sistema de obtención de imágenes, el operario del sistema afronta un problema mayor relacionado con la formación de reflexiones entre la base del pocillo y la superficie líquida del medio de cultivo por la existencia de un menisco en el medio de cultivo. La imagen obtenida por el dispositivo de detección óptica es por lo tanto particularmente compleja, o incluso algunas veces imposible de procesar.

45 **[0016]** Además de las dificultades en analizar la imagen relacionadas con el menisco formado en la superficie del medio de cultivo, el operario del experimento también tiene que afrontar un problema relacionado con el paralaje entre la imagen de los pocillos dispuestos en el centro de la microplaca, y la imagen de los pocillos dispuestos en el extremo de la microplaca, cuando el/ella desea leer simultáneamente las imágenes correspondientes a cada pocillo de la microplaca. De hecho, si la base en el pocillo central puede ser fácilmente distinguida, esto no ocurre para la base en la periferia de la microplaca. La imagen obtenida está de hecho alterada por la imagen de la pared del pocillo (cara inferior y cara superior), y el cambio entre la base del pocillo, la superficie del menisco formado por el líquido contenido en el pocillo, y la apertura superior del pocillo. Tal aire plástico (o cristal o cualquier otro material transparente), plástico (o cristal o cualquier otro material transparente), medio de cultivo, dioptrías de aire del medio de cultivo, crean una imagen compuesta que es completamente más compleja a medida que el paralaje es importante, como la fuente de reflexiones, más particularmente, en la pared del pocillo.

55 **[0017]** La invención más particularmente aspira a resolver las dificultades encontradas por el operario del experimento durante el análisis de las imágenes de la base del pocillo proporcionando un método para leer imágenes en la base de los pocillos, y equipos adaptados, para hacer posible eliminar el efecto del menisco, o al menos limitar la interferencia del mismo.

60 **[0018]** Para este propósito y de acuerdo a un primer aspecto, la invención se refiere a un método para leer imágenes de la base de una placa provista con al menos un pocillo que contiene un medio de cultivo para microorganismos, caracterizado en que incluye los siguientes pasos:

- 65 i) formar una placa opaca cubriendo la superficie del medio de cultivo para formar una base para la lectura,

ii) obtener imágenes de la base del pocillo usando un dispositivo de imagen óptico a intervalos predeterminados de tiempo.

5 **[0019]** En el presente documento, la palabra “base” significa la pared más baja del pocillo, la cara de la pared concerniente siendo indiferentemente la cara interior o la cara exterior. Las partículas vistas están en el lado de la cara superior (en la base del pocillo).

10 **[0020]** Dentro del ámbito del estudio del desarrollo de una biopelícula en el medio de cultivo, el paso de obtener imágenes comprende una primera obtención de imágenes de la base del pocillo correspondiente a una imagen de referencia, y al menos una segunda obtención de imágenes tras la aplicación de un campo magnético, eléctrico, o electromagnético en el medio de cultivo, dicho medio conteniendo al menos una partícula que es magnética, magnetizable o cargada eléctricamente o cubierta con al menos una capa magnética o magnetizable.

15 **[0021]** Preferiblemente la capa opaca se obtiene por la deposición en el pocillo de una composición que no es miscible con el medio de cultivo.

20 **[0022]** Así, gracias a la deposición de un producto opaco que no es miscible con el medio de cultivo en la superficie de dicho medio, las reflexiones entre la base de los pocillos y la superficie del líquido se eliminan, la lectura de imágenes siendo mejoradas en lo que respecta a la claridad.

[0023] Ventajosamente, la capa opaca se obtiene por la deposición en el pocillo de una composición que tiene una densidad menor que la del medio de cultivo, para permanecer en la superficie del medio de cultivo.

25 **[0024]** Adicionalmente, para optimizar la claridad de la imagen, la capa opaca se hará para que forme, en la superficie del medio de cultivo, una capa homogénea que está distribuida uniformemente.

[0025] La capa opaca formada será ventajosamente opaca y no reflectante, para eliminar el efecto “espejo” del menisco.

30 **[0026]** De manera similar, para evitar cualquier interacción física y/o química con el medio de cultivo, la composición que compone la capa opaca será ventajosamente inerte. De manera similar, respecto al operario, es preferible usar una composición no tóxica.

35 **[0027]** Ventajosamente, la capa opaca comprende aceite translúcido que contiene un pigmento miscible o macropartículas repelentes de agua.

40 **[0028]** De acuerdo a una realización preferida de la invención, el método comprenderá además, con vista a analizar las imágenes leídas, un paso anterior de registrar la base del pocillo para recuperar imágenes tomadas por el dispositivo óptico de las imágenes de la pared del pocillo, y así analizar las imágenes de la base del pocillo solamente. Este registro previo de la base del pocillo hace por lo tanto posible resolver el problema relacionado con el paralaje entre la imagen de los pocillos en el centro de la microplaca, y la imagen de los pocillos en el extremo de la microplaca.

45 **[0029]** De acuerdo a un segundo aspecto, la invención se refiere a una placa que comprende una pluralidad de pocillos destinados a recibir muestras de un medio de cultivo de microorganismos, caracterizada en que la base de los pocillos incluye medios de registro haciendo posible registrar la periferia de la base del mencionado pocillo.

50 **[0030]** Preferiblemente, el medio de registro consiste de una pluralidad de marcas localizadas en la base de los pocillos y posicionadas como una extensión de las paredes exteriores de los pocillos.

55 **[0031]** La formación de registros, y en particular marcas, como cavidades o relieves, en la base del pocillo, y en la extensión de las paredes laterales del pocillo, permite un mejor registro de la base de los pocillos, y por lo tanto la solución al problema relacionado con el paralaje entre la imagen de los pocillos en el centro de la microplaca, y la imagen de los pocillos en el extremo de la microplaca.

[0032] Ventajosamente, la base de los pocillos comprende tres marcas distribuidas a lo largo del ángulo de 120 grados.

60 **[0033]** Para permitir la obtención de imágenes a través de la base, los pocillos estarán provistos con una base transparente.

[0034] Otros objetos y ventajas de la invención aparecerán tras la lectura de la siguiente descripción, y al referirse a los dibujos adjuntos, en donde:

65 - La Figura 1 ilustra pocillos que contienen un medio de cultivo que está cubierto o no con una capa opaca y la imagen correspondiente obtenida de la base de los pocillos;

- La Figura 2 es una vista de la base de un pocillo de acuerdo a una realización particular de la invención.

- 5 **[0035]** En referencia a las Figuras 1 y 2, se describen el equipamiento y un método que hacen posible obtener imágenes de un medio de cultivo uno y que su análisis actuará con el fin de estudiar el desarrollo de una biopelícula en el mencionado medio 1.
- 10 **[0036]** Con este propósito, el equipamiento incluye una microplaca 10 que comprende los pocillos 2 en donde el medio de cultivo 1 se posiciona. En el ejemplo ilustrado, la microplaca 10 incluye ocho pocillos alineados 2.
- 15 **[0037]** Las bolas magnéticas 3 están posicionadas en la base de cada pocillo 2. Dichas bolas magnéticas pretenden hacer posible medir la viscosidad del medio de cultivo midiendo el grado de libertad de las bolas. De hecho, dependiendo del grado de desarrollo de los microorganismos, el movimiento de las bolas magnéticas bajo el efecto de un campo magnético, eléctrico o electromagnético será más o menos entorpecido por la biopelícula. Y, a partir de las mediciones de la viscosidad del medio de cultivo a intervalos de tiempo dados, se realizarán el modelado del desarrollo y el comportamiento de la biopelícula en el medio de cultivo 1. Dicha medición es realizada preferiblemente comparando una imagen de la base del pocillo antes del efecto del campo magnético, eléctrico o electromagnético, y la imagen tras dicho efecto.
- 20 **[0038]** Para permitir la obtención de imágenes por un dispositivo óptico, del tipo scanner, los pocillos 2 ventajosamente tienen una base transparente 4.
- 25 **[0039]** Como las biopelículas principalmente se desarrollan en un ambiente acuoso, y se adhieren a superficies sumergidas, es decir las bolas magnéticas 3, el medio de cultivo 1 seleccionado, en el ejemplo ilustrado, es agua.
- 30 **[0040]** Para eliminar las reflexiones entre la base de los pocillos 2 y la superficie del medio de cultivo 1, que interfiere con la lectura y la interpretación de las imágenes, se posiciona una capa en la base de lectura 5 en la superficie del mencionado medio de cultivo 1.
- 35 **[0041]** Esta capa de la base de lectura 5 se compone de una composición que no es miscible con agua, el medio de cultivo 1 siendo acuoso y que tiene una densidad que es menor que la del medio de cultivo 1. Así, la capa de la base de lectura 5 permanece i) perfectamente separada del medio de cultivo 1, y ii) sobre el menisco, creando así una base de imagen opaca.
- 40 **[0042]** Preferiblemente, se elegirá una composición blanca, como un "pigmento de aceite" diluido en aceite, o una composición el color de la cual está en contraste con el color que se va a detectar en los pocillos 2.
- 45 **[0043]** Además, la composición seleccionada será preferentemente químicamente inerte y físicamente contra el medio de cultivo 1, y no es tóxico para simplificar su manipulación.
- 50 **[0044]** Además, la composición colocada en la superficie del medio de cultivo 1 deberá estar compuesta preferiblemente de una capa opaca no reflectante, para eliminar el efecto "espejo" del menisco.
- 55 **[0045]** Preferiblemente pero no exclusivamente, la composición incluye un aceite translúcido que contiene un colorante miscible, sin ningún coeficiente de partición con el agua, o un aceite translúcido mezclado con micropartículas repelentes de agua, como el Téflon® micronizado.
- 60 **[0046]** A pesar de la implementación del mismo es más difícil, los polvos o ceras repelentes de agua también pueden ser usados para hacer la capa opaca.
- [0047]** La capa de la base de lectura 5, así compuesta y formada en la superficie del medio de cultivo, hace posible eliminar las reflexiones formadas por la superficie del medio de cultivo 1.
- [0048]** Cuando la composición es depositada en el pocillo 2 y se forma una capa opaca preferiblemente uniforme (sin un grosor excesivo) cubriendo toda la superficie del mencionado medio 1, en la superficie del medio de cultivo 1, la microplaca 10 se posiciona sobre el scanner que se pretende obtenga las imágenes de la base de los pocillos 2 por primera vez (imágenes de referencia), después se toman una pluralidad de imágenes, en intervalos de tiempo dados, tras la aplicación de un campo magnético, eléctrico o electromagnético durante un tiempo dado (del orden de un minuto por ejemplo) de acuerdo al principio descrito en la solicitud de patente WO2005/090944. Comparando las imágenes con un software de análisis de imagen, es posible estimar el grado de inmovilización de las partículas. Si las partículas son móviles (sin la presencia de microorganismos por ejemplo), forman una masa opaca en el punto de máxima intensidad del campo magnético (o eléctrico o electromagnético). Si las partículas están inmovilizadas, no se puede ver diferencia entre ambas imágenes. Dependiendo de la evolución del desarrollo de la biopelícula, se puede observar una evolución de la diferencia entre ambas imágenes.

- [0049] En la Figura 1, se ilustran las imágenes de la base 4 de los pocillos leídos por el scanner, con los cuatro pocillos 2 más a la izquierda conteniendo un medio de cultivo 1 cubierto por una capa de la base de lectura 5, los cuatro pocillos 2 más a la derecha conteniendo un medio de cultivo 1 sin ninguna capa de la base de lectura.
- 5 [0050] La imagen de la base 4 de los cuatro pocillos 2 más a la derecha muestra claramente la presencia del menisco 6 que hace la interpretación de la imagen más difícil, mientras que no aparece menisco cuando los pocillos tienen una capa de la base de lectura 5 (en referencia a los cuatro pocillos más a la izquierda).
- 10 [0051] La interpretación de una imagen cuando el pocillo no tiene la capa de la base de lectura 5 es más difícil ya que el problema relacionado con el efecto de paralelaje que es máximo en el extremo de la microplaca, se añade al problema de la presencia del menisco.
- 15 [0052] Así, para remediar este último problema, los pocillos 2 estarán ventajosamente provistos de, las bases 4 de las que tienen las marcas 7, como una extensión de las paredes laterales (en referencia a la Figura 2).
- [0053] De acuerdo a una realización preferida de la invención, la base 4 de los pocillos 2 comprende tres marcas espaciadas entre sí a lo largo de un ángulo de 120 grados, para definir claramente la base 4 de los pocillos 2.
- 20 [0054] Ventajosamente, las marcas 7 son agujeros con forma piramidal.
- [0055] La invención descrita en la presente se da como un ejemplo. Se debe entender que las personas expertas en la materia pueden hacer varias modificaciones en la invención sin abandonar el ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para leer imágenes de una base de una placa provista con al menos un pocillo (2) que contiene un medio de cultivo (1) de microorganismos caracterizado porque consiste de:
- i) formar una placa opaca (5) cubriendo una superficie del medio de cultivo (1) para formar una base de lectura, y
- ii) obtener imágenes, en intervalos de tiempo específicos, la base del pocillo (2) usando un dispositivo óptico de obtención de imágenes.
- 10 **2.** El método de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque el paso de obtención de imágenes comprende una primera obtención de imágenes de la base del pocillo (2) correspondiente a una imagen de referencia, después al menos una segunda obtención de imágenes tras la aplicación de un campo magnético, eléctrico o electromagnético en el medio de cultivo (1), el medio conteniendo al menos una partícula que es magnética, magnetizable, cargada eléctricamente o cubierta con al menos una capa magnética o magnetizable.
- 15 **3.** El método de acuerdo a la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado porque la capa opaca (5) está hecha por la deposición en el pocillo (2) de una composición no miscible con el medio de cultivo (1).
- 20 **4.** El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la capa opaca (5) está hecha por la deposición en el pocillo (2) de una composición que tiene una densidad menor que la del medio de cultivo (1).
- 25 **5.** El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la capa opaca (5) está hecha para formar en la superficie del medio de cultivo (1), una capa homogénea y uniformemente distribuida.
- 6.** El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la capa opaca (5) formada es una capa opaca no reflectante.
- 30 **7.** El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la capa opaca (5) formada es inerte.
- 8.** El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la capa opaca (5) comprende un aceite mineral translúcido que contiene un pigmento miscible.
- 35 **9.** El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la capa opaca (5) comprende un aceite translúcido que contiene macro partículas repelentes de agua.
- 40 **10.** El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque, para analizar las imágenes desarrolladas, la base (4) del pocillo (2) está localizada de tal forma que sólo se analizan las imágenes correspondientes a la base (4) del pocillo (2).

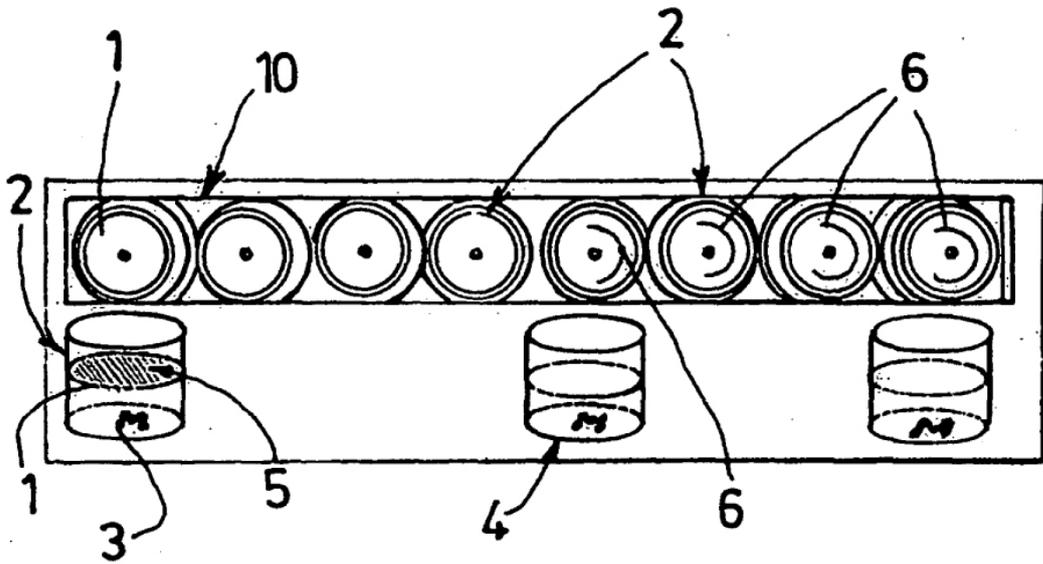


FIG. 1

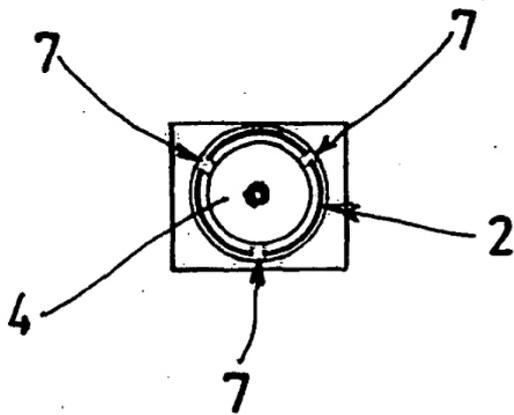


FIG. 2