

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 708**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09720139 .6**
96 Fecha de presentación: **30.01.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2255197**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN Y/O DE CUANTIFICACIÓN Y/O DE IDENTIFICACIÓN IN VITRO DE BACTERIAS EN UN MATERIAL BIOLÓGICO.**

30 Prioridad:
01.02.2008 FR 0800552

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2012

73 Titular/es:
Apoh Technologies SA
94 allée des Fauvettes
34280 La Grande Motte, FR

72 Inventor/es:
STEFAS, Ilias

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 376 708 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

Procedimiento de detección y/o de cuantificación y/o de identificación in vitro de bacterias en un material biológico.

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o de cuantificación y/o de identificación in vitro de bacterias en un material biológico.

5 En la presente descripción, se entiende por "material biológico" un tejido biológico, una preparación o un extracto obtenido de tejido biológico, líquido o sólido, o un medio, natural o no, susceptible de contener bacterias, por ejemplo, un agua de flujo o un agua de lavado de frutas y legumbres. Dicho material también puede ser una mezcla de al menos dos materiales tales como se han definido anteriormente; puede prepararse, por lo tanto, principalmente, a partir de tejidos, de órganos, de sales o de líquidos biológicos de un enfermo que padece una
10 afección u obtenerse a partir de cultivos "in vitro"; dicho material biológico puede ser también un suero, plasma, orina, líquido céfalo-raquídeo, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido seminal o líquido ascítico.

Ya se ha descrito una glicoproteína plasmática denominada β 2-glicoproteína I, o también abreviado " β 2GPI"; la secuencia de esta glicoproteína humana se ha indicado principalmente en los artículos de J. LOZIER et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, p. 3640-3644 (julio 1984) y de T. KRISTENSEN et al., FEBS Letters, Vol. 289, p. 183-186 (1991). Se ha constatado que esta proteína β 2GPI presenta un polimorfismo: la denominación β 2GPI se considerará de ahora en adelante en este texto como genérica para todas las formas.
15

En la solicitud internacional WO 94/18569, se ha indicado que determinados compuestos infecciosos, en particular proteínicos, se fijaban sobre la forma de β 2GPI que se había descrito en la patente francesa 2 701 263. Se ha propuesto en el documento WO 94/18569, un procedimiento de detección y/o de dosificación de compuestos virales en el que se fijan los compuestos infecciosos virales sobre la forma de β 2GPI utilizada; se añade por lo tanto esta forma de β 2GPI sobre los compuestos infecciosos virales contenidos en un material biológico, de forma que se separan los compuestos virales así capturados para detectarlos y/o dosificarlos. En la patente europea EP 775 315, se ha descrito la formación de un complejo entre un compuesto infeccioso, en particular proteínico, y una forma cualquiera de β 2GPI; pudiendo ser el compuesto infeccioso, principalmente, una bacteria. De estos documentos se desprende que la β 2GPI es susceptible de fijarse sobre un soporte sólido plano, tal como los fondos de pocillos de una placa de microtitulación, y que la β 2GPI así capturada sobre este soporte sólido plano, es susceptible de fijar las bacterias presentes en muestras clínicas, biológicas o medioambientales con concentraciones muy bajas. Se sabe, además, que dichas muestras pueden contener sustancias que inhiben, al menos parcialmente, la detección de los patógenos, sustancias que, consecuentemente, pueden disminuir la sensibilidad de la detección. Es por lo tanto importante poder capturar y concentrar estos patógenos para eliminar las sustancias que inhiben su puesta de manifiesto.
20
25
30

Los estudios de la empresa solicitante han mostrado que la fijación de la β 2GPI sobre el fondo de pocillos de placas de titulación, se hacía gracias a una conformación particular de la β 2GPI, conformación que permitía posteriormente la formación de un complejo de la β 2GPI con un compuesto infeccioso. La bibliografía ha destacado por otra parte que la conformación de la β 2GPI variaba con su fijación sobre una superficie sólida (Matsuura et al., J. Exp. Med. 179, p. 457-462 (1994)). Ya se había descrito (A. IWATA et al., Biol. Pharm. Bull. 26(8), p. 1065-1069 (2003)) un procedimiento de concentración de virus utilizando microbolas magnéticas sulfonadas sobre las que los virus quedaban capturados, obteniéndose la concentración de los virus gracias al hecho de que las microbolas eran magnéticas y podían separarse del medio infeccioso por acción de un campo magnético. Desgraciadamente, el resultado de esta técnica era esencialmente función de la captura de los virus sobre las microbolas. Este documento explica de forma detallada que determinados virus sin cubierta no se fijan sobre las bolas de polietilénimina y que es necesario utilizar microbolas sulfonadas para concentrar determinados virus. Además, para determinados virus, era necesario añadir en el medio cationes divalentes. Resulta de esta constatación que, según la naturaleza del virus, el polímero que constituye las microbolas debe ser diferente, injertado o no, y que los iones divalentes son necesarios o no; las bolas deben prepararse, por lo tanto, una por una en función del virus a concentrar. Las mismas constataciones resultan del documento E. UCHIDA et al., Journal of Virological Methods, 143, p. 95-103 (2007), que se refiere a la concentración de los virus de las hepatitis A, B, C humanas. En presencia de una muestra que contiene un virus no identificado a detectar, no es posible determinar qué naturaleza de las microbolas es susceptible de proporcionar un lugar para una captura del virus de interés.
35
40
45

Consecuentemente, habida cuenta los inconvenientes que existen para la fijación de virus sobre las microbolas, un experto en la técnica no se inclinaría a investigar una fijación de bacterias sobre microbolas. La empresa solicitante, sin embargo, ha estado en contra de este prejuicio desfavorable proponiendo, según la presente invención, interponer, entre una microbola y una bacteria a fijar encima, una molécula de β 2GPI. El estado de la técnica ha permitido determinar la naturaleza de los soportes sólidos que permiten una buena captura de la β 2GPI; la fijación de la β 2GPI sobre la microbola se efectúa sin que el polímero de la microbola se haya modificado en función de la bacteria a fijar posteriormente. Y, además, se ha constatado que la fijación de la β 2GPI sobre la microbola no perturbaba la captura de la bacteria sobre la β 2GPI; ahora bien, este último punto era totalmente inesperado porque no se podía prever que la conformación de la β 2GPI fijada sobre una microbola permitiría la captura de un agente patógeno sobre la glicoproteína. Por cierto y a título complementario, un elemento disuasivo para resultar en la
50
55

invención provenía del hecho de que se sabía que la β 2GPI tenía una tendencia a auto-polimerizarse (véase: Thrombosis Research, 108, p. 175-180 (2003)), lo que tiene el riesgo de comportar una aglutinación de las microbolas portadoras de β 2GPI, aglutinación que, por supuesto, hace impensable la fijación de agentes patógenos sobre las moléculas de β 2GPI.

5 La presente invención tiene, consecuentemente, por objeto un procedimiento de detección y/o de cuantificación y/o de identificación in vitro de bacterias presentes en un medio fluido M que constituye un material biológico, procedimiento en el que, de forma conocida, se prepara una suspensión, en un medio líquido de suspensión, de microbolas delimitadas por una superficie externa constituida por un material polimérico sólido susceptible de fijar proteínas, caracterizado por el hecho de que consta de las etapas siguientes:

10 a) en un tampón apropiado, se asegura una carga de microbolas de la suspensión con proteínas β 2GPI por acoplamiento con una cantidad suficiente de proteínas β 2GPI, bien de forma pasiva en un medio de suspensión, bien utilizando un protocolo de unión química conocido;

b) se ponen en contacto, en un contenedor, dichas microbolas cargadas con proteínas β 2GPI con el medio fluido M en las condiciones apropiadas para asegurar, sin la presencia de iones de metal oxidante, una fijación suficiente de las bacterias sobre las proteínas β 2GPI contenidas en las microbolas;

15 c) se separan las microbolas así preparadas de su medio de suspensión, se evacua dicho medio de suspensión fuera del contenedor para obtener un residuo con una alta concentración de bacterias;

d) y se detectan y/o cuantifican y/o identifican las bacterias del residuo.

20 Ha sido completamente sorprendente constatar que, cuando se aplica el procedimiento definido anteriormente y se lavan las microbolas que constituyen el residuo con una alta concentración de bacterias, las bacterias captadas por las microbolas conservan su capacidad de multiplicación. En un modo ventajoso de aplicación, el procedimiento según la invención se caracteriza por lo tanto por el hecho de que se lavan las microbolas que constituyen el residuo, se ponen en contacto con un medio de cultivo susceptible de permitir su multiplicación y, de forma conocida, se detectan y/o cuantifican y/o identifican las bacterias a partir de dicho medio de cultivo. Para permitir la multiplicación de las bacterias del medio M fijado sobre las microbolas, se asegura su incubación, en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, sobre el medio de cultivo durante un tiempo y a una temperatura apropiados y se deduce de los resultados de cultivo obtenidos, la existencia y/o la cuantificación y/o la identificación de dichas bacterias. El medio fluido M puede ser, principalmente, un hemocultivo y, en este caso, después de haber obtenido el residuo con una alta concentración de bacterias y de haberlo lavado, se pueden volver a poner las microbolas en suspensión en un caldo de cultivo, por ejemplo un caldo tripticasa-soja denominado "BTS" y depositar este caldo en un medio de cultivo con sangre, por ejemplo un medio "Columbia" con sangre de carnero.

30 Se pueden identificar las bacterias por coloración Gran y/o por subcultivos, en medio selectivo o no; se pueden cuantificar las bacterias por lectura de la densidad óptica, por ATP-metría o por PCR.

35 Se elige, preferentemente, el material sólido constitutivo de la superficie externa de las microbolas del grupo formado por las materias plásticas y los elastómeros, conteniendo o no dicho material grupos reactivos injertados sobre la superficie externa de las microbolas para asegurar una unión química con las proteínas β 2GPI; pudiendo tener ventajosamente las microbolas una forma sensiblemente esférica y un diámetro medio comprendido entre 1 y 100.000 nm. Según una primera variante, se separan las microbolas de su medio de suspensión por centrifugación; pero según una segunda variante preferida, se eligen las microbolas que tienen un núcleo formado por una (o varias) partícula(s) de material magnético para permitir su separación respecto del medio de suspensión gracias a un campo magnético. Dichas microbolas magnéticas están disponibles en el mercado: por ejemplo, están constituidas por un núcleo magnético recubierto de una matriz polimérica de poliestireno. El campo magnético que permite la separación de las microbolas respecto de su medio de suspensión, puede crearse por un imán simple permanente que se acerca al contenedor para realizar la etapa c) del procedimiento según la invención.

45 El único límite respecto a la elección del material constitutivo de las microbolas, es poder acoplar la β 2GPI: se pueden utilizar, por ejemplo, microbolas magnéticas correspondientes a la denominación comercial "microesferas superparamagnéticas Estapor®" vendidas por la empresa "MERCK". Como se ha indicado anteriormente, el acoplamiento de la β 2GPI sobre las microbolas puede hacerse bien de forma pasiva, bien utilizando un protocolo de acoplamiento químico. Para realizar un acoplamiento pasivo con las microbolas "Estapor®" citadas anteriormente, se ponen las microbolas en suspensión en un tampón que contiene la β 2GPI, a un pH comprendido entre 3,5 y 10,5 y mejor entre 5,5 y 9,5. El tampón utilizado forma parte de los tampones habituales en biología y, principalmente, puede ser un tampón acetato, fosfato, borato, Tris. La mezcla microbola/ β 2GPI se incuba a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C durante un tiempo comprendido entre 10 min y 24 h con agitación, preferentemente una agitación horizontal suave y constante. A continuación, las microbolas se separan magnéticamente o se centrifugan y el sobrenadante se retira. El sedimento que contiene las microbolas se pone en suspensión en un tampón de conservación, que es, preferentemente, el mismo que el utilizado posteriormente para el acoplamiento, teniendo este tampón un pH comprendido entre 6 y 9. Preferentemente, se efectúa la carga de las microbolas en proteínas β 2GPI poniéndolas en un medio líquido de suspensión que contiene, en disolución acuosa, de 10^{-6} a 100

mg de β 2GPI por gramo de peso seco de microbolas, estando comprendida la concentración de β 2GPI del medio entre 10^{-5} y $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y agitando la suspensión así constituida durante 15 a 60 min a una temperatura comprendida entre 30°C y 45°C .

5 La muestra que contiene el patógeno se pone en contacto con las microbolas cargadas, bien directamente, bien después de su dilución en un tampón, cuyo pH está comprendido entre 5 y 9, preferentemente entre 5,6 y 8. El complejo, que se forma entre la β 2GPI y el patógeno, se incuba a continuación durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 min y 24 h, preferentemente, entre 30 min y 2 h a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C , preferentemente, aproximadamente 37°C . Después de la incubación, la muestra que no ha reaccionado con la β 2GPI fijada sobre las microbolas, se elimina por centrifugación o imantación de las microbolas. Las microbolas así
10 aisladas pueden utilizarse para la detección y/o la cuantificación del patógeno. La separación y/o la dosificación y/o la cuantificación del patógeno unido al soporte por la β 2GPI puede hacerse por cualquier medio conocido tal como la infecciosidad, una reacción enzimática específica, un marcador fluorescente o radiomarcado, la detección de ácido nucleico específico por hibridación con una sonda marcada, una reacción en cadena obtenida con una polimerasa (denominada "PCR"), una dosificación, una numeración, una visualización, un procedimiento óptico, una microscopía
15 electrónica o no.

Para comprender mejor el objeto de la invención, se van a describir ahora, a título de ejemplos puramente ilustrativos y no limitativos, varios modos de aplicación.

EJEMPLO 1: Fijación de una bacteria sobre microbolas cargadas con β 2GPI

20 La bacteria que se ha utilizado, es una cepa de Escherichia Coli (E. Coli) suministrada por el Centro de conservación de productos agrícolas (CPA). Se incuba un pre-cultivo a 37°C durante 16 h en medio LB (Luria Bertani) que tiene la composición siguiente:

Bacto triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

25 pH 7,5

Agua csp 1.000 g

Este pre-cultivo se utiliza inmediatamente o se conserva a $4,5^{\circ}\text{C}$.

30 Las microbolas destinadas a fijar las bacterias que se utilizan en este ejemplo son microbolas magnéticas vendidas por la empresa MERCK bajo la denominación "microesferas superparamagnéticas Estapor®" que tienen un diámetro comprendido entre 0,300 y 0,500 μm .

Estas microbolas se ponen en suspensión en un tampón acetato a un pH de 6,0 que contiene la β 2GPI. La concentración de β 2GPI en este tampón de acoplamiento es $100 \mu\text{g}/\text{ml}$; las microbolas se incuban en el tampón con agitación suave y constante a una temperatura de 25°C durante 3 horas. Las microbolas se centrifugan a 1.500 giros/minuto y el sobrenadante se retira; el sedimento de la centrifugación se pone en suspensión en el mismo
35 tampón que el utilizado para el acoplamiento de la β 2GPI, lo que forma la suspensión de microbolas cargadas con β 2GPI que se quiere ensayar.

Los cultivos de bacterias a estudiar se ponen en tubos de hemólisis de 1 ml con cantidades de microbolas diferentes según los tubos. Los tubos se ponen con agitación horizontal para mezclar bien las microbolas y cada tubo se
40 incuba a 37°C o a temperatura ambiente ($T_A = 22^{\circ}\text{C}$); el tiempo de incubación es variable según el experimento realizado. En cada tubo, se separan las microbolas de la fase líquida mediante un imán situado en la parte externa contra la pared del tubo y se mide la densidad óptica (DO) del sobrenadante a 600 nm con un espectrofotómetro "Eppendorf".

En ausencia de microbolas, la DO al inicio del experimento, es igual a 0,2 y crece durante el tiempo según un crecimiento bacteriano normal; en presencia de microbolas, la DO permanece casi estable durante
45 aproximadamente una hora y después crece como en ausencia de microbolas (véase la fig. 1A). Esto sugiere que las bacterias son fijadas sobre las microbolas, lo que ha retrasado el crecimiento bacteriano normal. La figura 1 muestra que, para una misma cantidad de microbolas y un mismo tiempo de incubación, la DO es mayor cuando la temperatura de incubación es más elevada, lo que es normal para una bacteria del tubo digestivo de mamíferos, cuyo crecimiento óptimo se sitúa alrededor de 37°C . Se constata igualmente, en esta misma figura, que para una
50 misma temperatura de incubación, la DO es tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de incubación. Se constata finalmente en la figura 1 que, para una incubación de una duración y temperatura dadas, la DO disminuye cuando la cantidad de microbolas aumenta.

Se han incubado igualmente las microbolas con el cultivo tamponado de E. Coli durante 1 h 30 con agitación. Se separan las microbolas magnéticamente, como anteriormente, y se desechan los sobrenadantes; se lavan las microbolas con medio de cultivo LB "fresco" y con una disolución de PBS correspondiente a la formulación siguiente:

NaCl 80 g
 5 KCl 74,562 g
 KH₂PO₂ 2,4 g
 Na₂HPO₄/2H₂O 29 g
 Agua csp 1.000 g

10 Se deja incubar el medio de cultivo durante una noche a 37^oC ó 20^oC y se mide la DO. Los resultados se proporcionan en la figura 2 en función de la cantidad de microbolas introducida inicialmente en el cultivo de E. Coli. Se constata que la DO después de la incubación a 20^oC evoluciona poco en función de la cantidad de microbolas, mientras que es creciente con la cantidad de microbolas para una incubación a 37^oC.

15 Se ha estudiado igualmente el estado fisiológico de las bacterias capturadas por las microbolas. Se efectúa una dosificación de ATP (adenosina trifosfato) y de los nucleótidos adenílicos (NA) intracelulares de las bacterias. Se sabe que el ATP es un indicador específico de la célula viva porque, después de la muerte celular, es degradado muy rápidamente en ADP(adenosina difosfato) y AMP (adenosina monofosfato) por las ATPasas. Se sabe, por otra parte (solicitud de patente francesa 04-11084 depositada el 19 de octubre de 2004) que la suma ATP + ADP +AMP permanece constante e igual a NA durante el crecimiento celular. Se han medido por bioluminiscencia las cantidades de ATP y de NA presentes en las microbolas después del contacto con E. Coli.

20 Para efectuar estas mediciones, se utilizan tubos de hemolisis en los cuales se ponen 10 µl de microbolas cargadas con β2GPI que se incuban con 1 ml del pre-cultivo bacteriano durante diferentes tiempos de incubación a una temperatura de 37^oC. Las bolas se separan por imantación (es decir, atracción por un imán permanente exterior al tubo) para recuperar el sobrenadante y se lavan con medio fresco. Después de una nueva imantación, se añaden a cada tubo 200 µl de extractante y 1 ml de una disolución tampón, siendo suministrados estos dos reactivos por la
 25 empresa "Control Life Technologies". Se deja actuar este extractante durante 10 min para:

- provocar la ruptura de las cubiertas de las bacterias con el fin de liberar los nucleótidos;
- inhibir rápidamente las reacciones enzimáticas, principalmente ATPásicas;
- tener un efecto destructor mínimo sobre los NA.

30 Se fracciona cada muestra en cuatro partes de 100 µl que se ponen en cuatro tubos pequeños rhesus de los que dos contienen 5 µl de disolución de enzimas liofilizadas a saber: fosfoenolpiruvato, adenilato quinasa y piruvato quinasa; en los tubos con enzimas, el AMP y el ADP se transforman en ATP. Se obtienen por lo tanto dos tubos (SE) que no han experimentado la acción enzimática y dos tubos (E) que la han experimentado. Se añaden a los cuatro tubos 5 µl de detector luminoso de ATP (luciferina/luciferasa) y se pasa un tubo (E) y un tubo (SE) en un
 35 luminómetro (Control Life 300), en el que se mide la emisión luminosa durante 5 s (resultado proporcionado en unidades relativas de luz (URL)). Con los dos tubos restantes, se efectúa una segunda medición después de añadir 5 µl de ATP estándar (10 pmoles/µl) en cada tubo: se utiliza el resultado para corregir los errores debidos a una inhibición eventual de la emisión luminosa porque el conocimiento de la segunda medición permite transformar la primera en picomoles.

Los resultados se proporcionan en las figuras 3 y 4.

40 En la figura 3, se ve un aumento de los NA intracelulares presentes en las microbolas en función del tiempo y una saturación de las microbolas en NA a partir de un tiempo de contacto de 80 min aproximadamente entre las microbolas y el cultivo de las bacterias inicial. La cantidad de ATP presente en las microbolas aumenta con el tiempo de contacto microbolas/cultivo; se constata una saturación correspondiente al hecho de que la captura de las bacterias por las microbolas depende de la superficie de las microbolas utilizadas; además, dado que el contenido
 45 de ATP de una célula es representativo de su actividad, también se puede deducir que las microbolas captan las bacterias y fijan las bacterias más activas.

Por otra parte, las mediciones de ATP y de NA en un tubo, se han hecho en función de la cantidad de microbolas utilizada en el tubo, efectuándose la incubación para la captura de las bacterias para todos los tubos a 37^oC durante
 50 1 h 30 con agitación: los resultados se proporcionan en la figura 4. Se constata un aumento del ATP y de los NA intracelulares cuando la cantidad de microbolas aumenta. Esto confirma que las microbolas captan las bacterias presentes en el medio.

5 Se sabe que, para las bacterias (véase D: CHAMPIAT, Biochimie luminescence et biotechnologie, Technoscope nº 51, Biofutur nº 110 y CHAMPIAT D. y LARPENT JP., Biochimie luminescence: Principes et applications, Edition Masson 1993), si la carga energética ATP/NA está comprendida entre 0,5 y 0,75, las bacterias están en fase de crecimiento. La tabla I proporcionada a continuación, se ha establecido utilizando los valores experimentales correspondientes a la figura 4 y muestran que la relación ATP/NA para un contacto microbolas/bacterias efectuado a 37°C está comprendida entre 0,5 y 0,7.

TABLA I

Temperatura	37°C			
Cantidad de microbolas	5 µl	10 µl	20 µl	40 µl
ATP/NA	0,64	0,69	0,67	0,64

10 Las microbolas fijan por lo tanto las bacterias en crecimiento, es decir, en plena actividad metabólica. La captura de E. Coli sobre las microbolas no inhibe por lo tanto el metabolismo bacteriano. Como ya se ha indicado anteriormente con respecto a la figura 2, las bacterias, que se han fijado sobre las microbolas, generan, en un medio y a una temperatura apropiadas, un cultivo, cuya DO aumenta en función de la concentración de microbolas, lo que quiere decir que, a pesar de su captura por las microbolas, las bacterias continúan multiplicándose.

15 El conjunto de estos resultados muestra que hay captura de las bacterias por las microbolas hasta una saturación debida a la cantidad de microbolas cargadas con β2GPI que se aplica. Las microbolas no inhiben el crecimiento bacteriano y no conllevan una mortalidad de las bacterias capturadas.

Se han realizado ensayos análogos con las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* y han proporcionado el mismo tipo de resultados.

EJEMPLO 2: Interacción de la β2GPI con las bacterias presentes en la sangre humana

20 Las microbolas utilizadas son las mismas que aquellas cuya preparación se ha detallado en el ejemplo 1.

Se han utilizado dos series de hemocultivos (hemocultivos I que comprenden 5 muestras y hemocultivos II que comprenden 35 muestras) que provienen de extracciones hospitalarias. Estos hemocultivos se realizan poniendo una extracción de sangre venosa (aproximadamente 10 ml) en matraces aerobios y anaerobios de tipo BacT/ALERT®3D. Estos matraces se incuban en un robot a 35°C durante al menos 5 días. Los matraces están equipados con un sistema de detección colorimétrica gracias a un sensor situado en la base de cada matraz. El dióxido de carbono producido por las bacterias en crecimiento, hace cambiar el color del sensor; este cambio de color es detectado por el robot e indica la presencia de un crecimiento bacteriano: estos hemocultivos se denominan positivos. En los matraces BacT/ALERT®3D se encuentran partículas de carbón activo, que inhiben los antibióticos potencialmente presentes en la sangre de los pacientes, mejorándose así la detección de los microorganismos. Para confirmar la presencia de las bacterias en los hemocultivos que se han revelado positivos en el robot, el hospital realiza un cultivo en gelosa con sangre. El conjunto de los resultados que provienen de los hospitales permite así identificar

- los hemocultivos positivos (positivos en el robot y positivos en cultivo),
- los hemocultivos negativos (negativos en el robot) y
- 35 - los hemocultivos falsamente positivos (positivos en el robot y negativos en cultivo).

Para ensayar la interacción de las microbolas cargadas con β2GPI con las bacterias presentes en la sangre, se extrae 1 ml de hemocultivo para cada muestra y se pone en un tubo de 15 ml. Se añaden diferentes cantidades de microbolas cargadas con β2GPI y cada tubo se incuba a 37°C con agitación horizontal. Las muestras se trasvasan a tubos siliconados de 2 ml. Los tubos se ponen en un campo magnético que retiene las microbolas sobre la pared y se toma el sobrenadante. Las microbolas se lavan dos veces con PBS estéril con la misma composición que se ha indicado anteriormente en el ejemplo 1; las microbolas se vuelven a poner en suspensión en 150 µl de medio de cultivo BTS (Bouillon Trypticasa-Soja) que tiene la formulación siguiente:

- Peptona de caseína 17,0 g
- Peptona de harina de soja 3,0 g
- 45 D(+)-glucosa 2,5 g
- Cloruro de sodio 5,0 g

Fosfato dipotásico 2,5 g

Agua csp 1.000 g

Este medio de cultivo BTS se llevó a ebullición y se autoclavó para hacerlo estéril antes de su uso.

5 Se toman 50 µl de la suspensión de microbolas así obtenida y se depositan en un matraz Petri en un medio "Columbia" con sangre de carnero, denominado "gelosa con sangre" (Laboratorios BioMérieux); esta gelosa, de color rojo vivo, contiene glóbulos rojos: constituye un medio rico, no selectivo, que permite el crecimiento de la mayor parte de las bacterias con interés médico. Los matraces Petri se incuban en la estufa a 37°C durante 24 horas. Este protocolo permite con las microbolas la detección de las bacterias presentes en los hemocultivos. Se han utilizado tres métodos para poner de manifiesto las bacterias capturadas por las microbolas: ATP-metría, cultivo en gelosa con sangre y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) seguidos o no de una secuenciación.

A) Hemocultivos I

a) ATP-metría

15 El método de la ATP-metría utilizado es el mismo idénticamente que el utilizado en el ejemplo 1. Para cada una de las muestras 1, 2, 6, 7, 8, se tomaron 3 veces 1 ml que se depositaron en tubos de 15 ml, lo que proporciona 3 sub-muestras. Se incuban las 15 sub-muestras a 37°C, con tiempos de incubación de 30, 60 ó 90 minutos para las 3 sub-muestras de una misma muestra.

20 No se detectó ninguna bacteria en las muestras 1, 2 y 7, independientemente de la cantidad de microbolas o del tiempo de incubación. Por el contrario, se detectan bacterias en las muestras 6 y 8 y los resultados se proporcionan en la figura 5. Estos resultados relativos a las 5 muestras corresponden a los obtenidos por el robot. La tabla II siguiente proporciona los resultados correspondientes a los cálculos de carga energética que se obtienen de los resultados de la figura 5: se constata que las bacterias presentes en los hemocultivos 6 y 8 están en fase de crecimiento.

TABLA II

	Muestra 6			Muestra 8		
Tiempo de incubación de la sub-muestra (en min)	30	60	90	30	60	90
ATP/NA	/	0,70	0,74	0,61	0,56	0,79

25 Esta primera parte del ejemplo 2A) estableció que las microbolas cargadas con β2GPI captan las bacterias presentes en los hemocultivos.

b) Puesta en cultivo

30 Se pusieron en cultivo sobre gelosa con sangre las bacterias fijadas con las diferentes concentraciones de microbolas en las muestras 1, 2, 6, 7, 8 como se ha indicado en a) anteriormente. Los resultados obtenidos en estas muestras después de 24 h de incubación a 37°C se presentan en la tabla III siguiente. Para los hemocultivos 6 y 8 la puesta en cultivo confirma los resultados encontrados independientemente en el hospital, lo que demuestra que las microbolas captan bien las bacterias presentes en los tubos.

TABLA III

Nº de muestra	Gérmenes identificados en el hospital	Condición de cultivo	Gérmenes identificados según la invención en gelosa con sangre				Coloración Gram
			Sin microbolas	Cantidad de microbolas			
				25 µl	50 µl	75 µl	
1	negativo	aerobia	/	/	/	/	/
		CO ₂	/	/	/	/	

ES 2 376 708 T3

2	negativo	aerobia	/	+		/	Bacilo (-)= pseudomonas
		CO ₂	/	/	/	/	
6	Pseudomonas	aerobia	+	++	+++	++++	Bacilo (-)= pseudomonas
		CO ₂	+	++	+++	++++	
7	negativo	aerobia	/	/	100 colonias con hemolisis	2/3 colonias con hemolisis	Cocobacilos (-)
		CO ₂	/	/	++++ con hemolisis	4 colonias con hemolisis	
8	S. marescens	aerobia	+	++	+++	++++	Bacilo (-)= pseudomonas
		CO ₂	+	++	+++	++++	

5 Para identificar las colonias bacterianas, se efectuó coloraciones de Gram y sub-cultivos sobre diferentes medios selectivos o no. Para el hemocultivo nº7 la identificación en el hospital proporcionó un resultado negativo mientras que se obtienen colonias utilizando microbolas. Se efectuó una coloración de Gram: el resultado indicó que se trataba de un cocobacilo Gran positivo; teniendo el cocobacilo una forma intermedia entre bacilo y coco, se sembró sobre los medios siguientes: medio MacKonkey, medio Chapman, medio TS, medio Cetrimida. Estos medios corresponden a las formulaciones siguientes:

TABLA IV

Medio	Chapman	T.S.	MacConkey	Cetrimida
Peptona	10 g		20 g	
Peptona tripsica de caseína		15 g		
Peptona papaínica de soja		5 g		
Peptona de gelatina				16 g
Lactosa			10 g	
Sales biliares nº2			1,5 g	
Extracto de carne de buey	1,0 g			
Cloruro de sodio	75 g	5 g	5 g	
Manitol	10 g			
Rojo de fenol	0,025 g			
Cristal violeta			0,001 g	
Rojo neutro			0,05 g	
Bromuro de tetradonio (cetrimida)				0,2 g
Ácido nalidíxico				15 g
Sulfato de potasio				10 g
Cloruro de magnesio				1,4 g
Agar-agar	15 g		15 g	
Agar (gelosa)		15 g		10 g

Los resultados han mostrado que esta cepa bacteriana crecía sobre todos los medios.

c) Método por PCR y secuenciación

- 5 Se efectuó una PCR seguida de una secuenciación del ADNr 16S.

El ADN bacteriano se extrae a partir de las bacterias que han sido capturadas por las microbolas; las bacterias se lisan añadiendo a las microbolas 100 µl de "Chelex 30%". La mezcla se incuba durante 10 minutos a 95°C; se efectúa una centrifugación durante 10 minutos a 10.000 giros/minuto. El sobrenadante que contiene el ADN se conserva a -20°C.

- 10 A 3 µl del ADN extraído se añaden 47 µl de la disolución de amplificación (Kit de Aislamiento de ADN Genómico AquaPure); las concentraciones finales son las siguientes:

- 5 µl: dXTP 200 mM
- 10 µl: TAMPÓN 5X
- 5 µl: MgCl₂ 2 mM

- 15 • 1 µl de cada cebador: cebador diluido a 200 mL:

27 f: GTGCTGCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG

1492 r: CACGGATCCTACGGGTACCTTGTTACGACTT

ES 2 376 708 T3

- 1 μ l: polimerasa Taq 5u/ μ L
- Agua PPI csp 50 μ L

Después de homogeneizar, las mezclas de reacción se ponen en un termociclador "Eppendorf" y se someten al programa siguiente:

5	94 ^o C: 1 min	} 35 ciclos
	60 ^o C: 1 min	
	72 ^o C: 2 min	
	72 ^o C: 10 min	

10 Los ADN se mantienen a 10^oC. La migración se hace sobre un gel de agarosa al 2% en tampón PBE 0,5X que contiene bromuro de etidio. El gel se observa bajo luz UV.

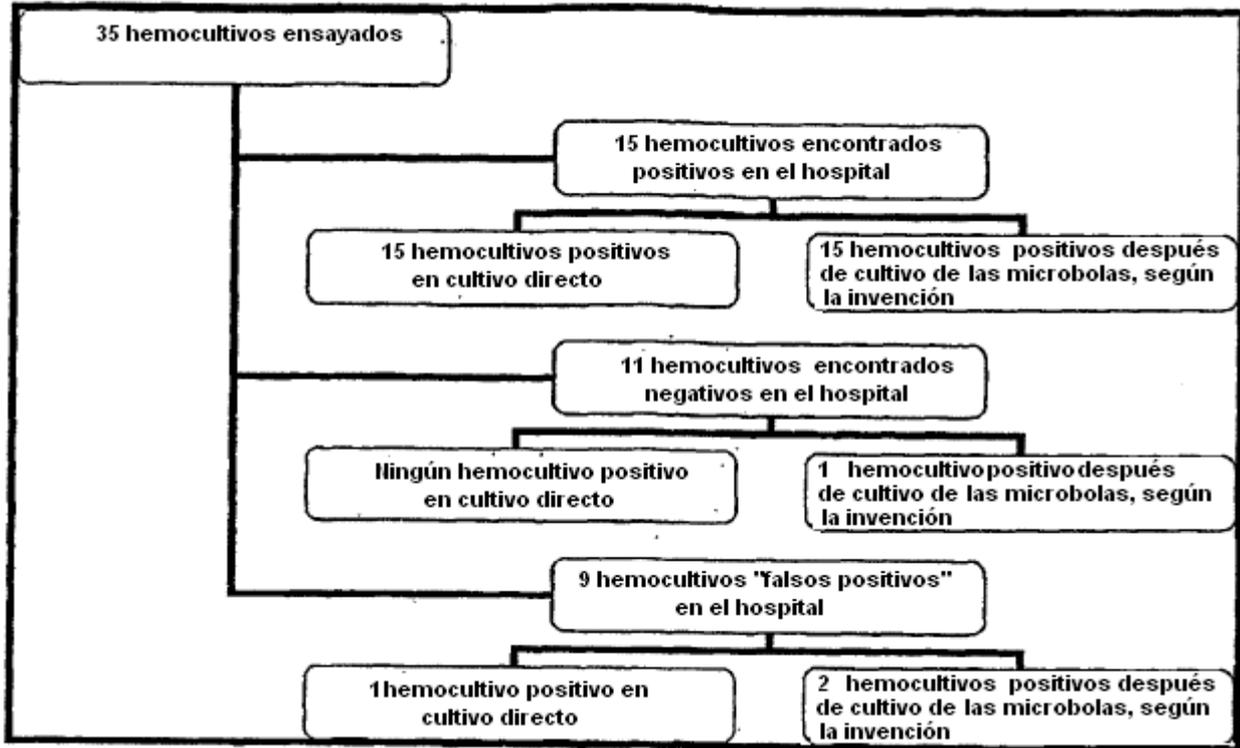
Los resultados de la PCR indican bien la presencia de una bacteria: se constata una fuerte señal positiva (véase la figura 6). La identificación de la bacteria puede hacerse por secuenciación de forma conocida.

15 Se constata por lo tanto que el procedimiento según la invención permite, gracias a la utilización de microbolas cargadas con β 2GPI, detectar e identificar bacterias en la sangre humana mientras que los métodos clásicos aplicados en el hospital no lo permiten.

B) Hemocultivos II

20 Se aplica la técnica definida al inicio del ejemplo 2: en un tubo de 15 ml, se deposita 1 ml de un hemocultivo y se le añade una determinada cantidad de microbolas cargadas con β 2GPI (aquí 25 ó 50 μ l), que se deja incubar en el medio. Después, se separan magnéticamente las microbolas, se lavan y se resuspenden en un tampón estéril. Se deposita esta suspensión en una gelosa con sangre en un matraz de Petri y se incuba durante 24 horas a 37^oC. El conjunto de los hemocultivos ensayados corresponde a la tabla V siguiente:

TABLA V



Para los hemocultivos positivos, las microbolas permiten confirmar los resultados obtenidos por un robot y por cultivo en el hospital. Las microbolas captan bien por lo tanto las bacterias presentes en los hemocultivos.

- 5 Para determinadas muestras, con 25 µl y 50 µl de microbolas, los resultados sugieren la presencia de un segundo tipo de bacterias no detectado en el hospital. Después de la identificación, se ha constatado que se trataba de un staphylococo (coco Gram positivo). Para las muestras 5054 que contiene *S. HOMINIS* y 5060 que contiene *P. MIRABILIS* que provienen de la misma persona, se han puesto de manifiesto sobre gelosa con sangre las dos bacterias en cada una de las dos muestras contrariamente a los resultados proporcionados por el hospital.
- 10 Para los hemocultivos negativos, las bolas han permitido confirmar los resultados encontrados en el hospital, salvo para un hemocultivo 2081 en el que las microbolas pusieron de manifiesto bacterias de tipo coco Gram positivas (Staphylococo). Para los falsos positivos, las microbolas han permitido igualmente poner de manifiesto bacterias, de tipo coco Gram positivas, para dos de las nuevos hemocultivos ensayados. Se constata que entre los hemocultivos que se habían constatado negativos en el hospital, un hemocultivo se revela positivo cuando las microbolas se cultivan sobre gelosa con sangre, lo que muestra que la invención permite mejorar la sensibilidad de la detección.
- 15

Las tablas VA, VB, VC y VD siguientes resumen los resultados encontrados:

TABLA VA

Cultivo en condición aerobia:

Nº hemoc.	Gérmenes identificados en el hospital	Gérmenes identificados sobre gelosa con sangre, según la invención			Gram	Aislamiento de bacterias + Gram				
		Sin microbolas	25 µL de microbolas	50 µL de microbolas		Sobre gelosa con sangre	Sobre Chapman	Sobre M.K	Gram	
1052	<i>K. pneumoniae</i>	Colonia opaca: +++ colonia blanca: +	Colonia opaca: +++	colonia opaca: +++ colonia blanca: +		Colonia opaca colonia blanca	+			Bacilo (-) = <i>K.pneumoniae</i> Bacilo (-) = <i>K.pneumoniae</i>
2058	<i>S. epidermidis</i>	Colonia blanca: ++ Colonia amarilla: + PS: presencia de hemolisis alrededor de las colonias.	Colonia blanca: ++ Colonia amarilla: + PS: presencia de hemolisis alrededor de las colonias.	Colonia blanca: ++ Colonia amarilla: + PS: presencia de hemolisis alrededor de las colonias.	Efectuado en la masa: Cocci (+) = S. <i>epidermidis</i> y bolas	Colonia blanca Colonia amarilla	+	+	/	Cocci (+)
1481	<i>E. faecalis</i>	Colonia 1: ++	Colonia 1: ++	Colonia 1: ++ Colonia 2: +	Colina 1: cocci (+) = <i>E. faecalis</i> Colonia 2 cocci (+)	Colonia 2	+	+	Colonia 2	Colonia 2 Cocci (+) = Staphylococo
7051	<i>E. coli</i>	Colonia 1: +++	Colonia 1: ++	Colonia 1: ++						

TABLA VB
Cultivos en condición aerobia:

Nº hemoc.	Gérmenes identificados en el hospital	Gérmenes identificados sobre gelosa con sangre, según la invención				Gram	Aislamiento de bacterias + Gram			
		Sin microbolas	25 µL de microbolas	50 µL de microbolas	Gram		Sobre gelosa con sangre	Sobre Chapman	Sobre M.K	Gram
5054	<i>S. hominis</i>	colonia 1: +++	colonia 1: +++ colonia 2: +	colonia 1: +++ colonia 2: +	Colonia 1: Cocci (+) <i>S. hominis</i> Colonia 2: Bacilo (-) <i>P. mirabilis</i>	Colonia 1: / Colonia 2: ++	Colonia 1 Colonia 2	+ /		
4351	Falso +	/	25 colonias: algunas con hemolisis y otras sin hemolisis	/	Cocci (+)	Se aísla una colonia	++ hay hemolisis ++ hay hemolisis	+	Cocci (+)	
7059	<i>E. coli</i>	Colonia 1: ++	Colonia 1: + Colonia 2: una sola colonia blanca	Colonia 1: ++	Colonia 1: cocobacilo	Colonia 2	+	Colonia 1: ++	Colonia 2: Cocci (+) Staphylococo Colonia 1: bacilo (-) <i>E. coli</i>	
5060	<i>P. mirabilis</i>	Colonia 1: +++	colonia 1: +++ colonia 2: +	colonia 1: +++ colonia 2: +	Colonia 2: Cocci (+) = <i>S. hominis</i> Colonia 1: Bacilo (-) = <i>P. mirabilis</i>	Colonia 1 Colonia 2	+	Colonia 1 Colonia 2	/ +	

Cultivos en condición aerobia:

TABLA VC

Nº hemoc.	Gérmenes identificados en el hospital	Gérmenes identificados sobre gelosa con sangre, según la invención			Gram
		<u>Sin microbolas</u>	<u>25 µL de microbolas</u>	<u>50 µL de microbolas</u>	
5055	<i>S. hominis</i>	Colonia 1: ++	Colonia 1: ++	Colonia 1: ++	
7096	<i>S. bovis</i>	/	/	/	
3353	<i>E. coli</i>	Colonia 1: ++	Colonia 1: ++	Colonia 1: ++	
3013	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia 1: ++	Colonia 1: ++	Colonia 1: ++	
3053	Corine bacterium sp	después de 24 h: / después de 48 h: ++	después de 24 h: / después de 48 h: ++	después de 24 h: / después de 48 h: ++	Bacilo (+) irregular que crece sobre las microbolas. Proporciona por lo tanto la impresión de una segunda colonia
2081	Negativo	/	8 colonias	15 colonias	Cocci (+): staphylococo
2075	Negativo	/	/	/	
3060	Levaduras	++	++	++	
2080	Negativo	/	/	/	

Cultivos en condición aerobia y CO₂:

TABLA VD

Nº hemo	Gérmenes identificados en el hospital	Condición de cultivo	Gérmenes identificados sobre gelosa con sangre, según la invención		
			<u>Sin microbolas</u>	<u>25 µL de microbolas</u>	<u>50 µL de microbolas</u>
1081	<i>E. coli</i>	Aerobia	+++	+++	+++
		CO ₂	++	++	
		Anaerobia	++	++	++
6032	Enterobacter cloaceae	Aerobia	+++	+++	+++
		Anaerobia	++	++	++
4362	Pseudomonas aeruginosa	Aerobia	+++	+++	+++
		anaerobia	/	/	/

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de detección y/o de cuantificación y/o de identificación in vitro de bacterias presentes en un medio fluido M que constituye un material biológico, procedimiento en el que, de forma conocida, se prepara una suspensión, en un medio líquido de suspensión, de microbolas delimitadas por una superficie externa constituida por un material polimérico sólido susceptible de fijar proteínas, caracterizado por el hecho de que consta de las etapas siguientes:
- a) en un tampón apropiado, se asegura una carga de microbolas de la suspensión con proteínas β 2GPI por acoplamiento con una cantidad suficiente de proteínas β 2GPI, bien de forma pasiva en un medio de suspensión, bien utilizando un protocolo de unión química conocido;
- 10 b) se ponen en contacto, en un contenedor, dichas microbolas cargadas con proteínas β 2GPI con el medio fluido M en las condiciones apropiadas para asegurar, sin la presencia de iones de metal oxidante, una fijación suficiente de las bacterias sobre las proteínas β 2GPI contenidas en las microbolas;
- c) se separan las microbolas así preparadas de su medio de suspensión, se evacua dicho medio de suspensión fuera del contenedor para obtener un residuo con una alta concentración de bacterias;
- d) y se detectan y/o cuantifican y/o identifican las bacterias del residuo.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se lavan las microbolas que constituyen dicho residuo, se ponen en contacto con un medio de cultivo susceptible de permitir su multiplicación y, de forma conocida, se detectan y/o cuantifican y/o identifican las bacterias a partir de dicho medio de cultivo.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que para permitir la multiplicación de las bacterias del medio M fijadas sobre las microbolas, se asegura su incubación en el medio de cultivo durante un tiempo y a una temperatura apropiados.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de que el medio fluido M es un hemocultivo.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por el hecho de que después de haber obtenido el residuo con una alta concentración de bacterias, se vuelven a poner las microbolas en suspensión en un caldo Tripticasa-Soja y se deposita este caldo en un medio de cultivo con sangre de carnero.
- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que se identifican las bacterias por coloración Gram y/o por subcultivos sobre medio selectivo o no.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por el hecho de que se cuantifican las bacterias por lectura de la densidad óptica, por ATP-metría o por PCR del lisado.
- 30 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por el hecho de que se elige el material sólido constitutivo de la superficie externa de las microbolas del grupo formado por las materias plásticas y los elastómeros, conteniendo o no dicho material grupos reactivos injertados sobre la superficie externa de las microbolas para asegurar una unión química con las proteínas β 2GPI.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por el hecho de que se eligen las microbolas que tienen una forma sensiblemente esférica y un diámetro medio comprendido entre 1 y 100.000 nm.
- 35 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por el hecho de que se eligen las microbolas que tienen un núcleo formado por una (o varias) partícula(s) de material magnético para permitir su separación respecto del medio de suspensión gracias a un campo magnético.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por el hecho de que se separan las microbolas de su medio de suspensión por centrifugación.
- 40 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por el hecho de que se efectúa la carga de las microbolas con proteínas β 2GPI poniéndolas en un medio líquido de suspensión que contiene, en disolución acuosa, de 10^{-6} a 100 mg de β 2GPI por gramo de peso seco de microbolas, estando comprendida la concentración de β 2GPI del medio entre 10^{-5} y $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y agitando la suspensión así constituida durante 15 a 60 minutos a una temperatura comprendida entre 30°C y 45°C .
- 45

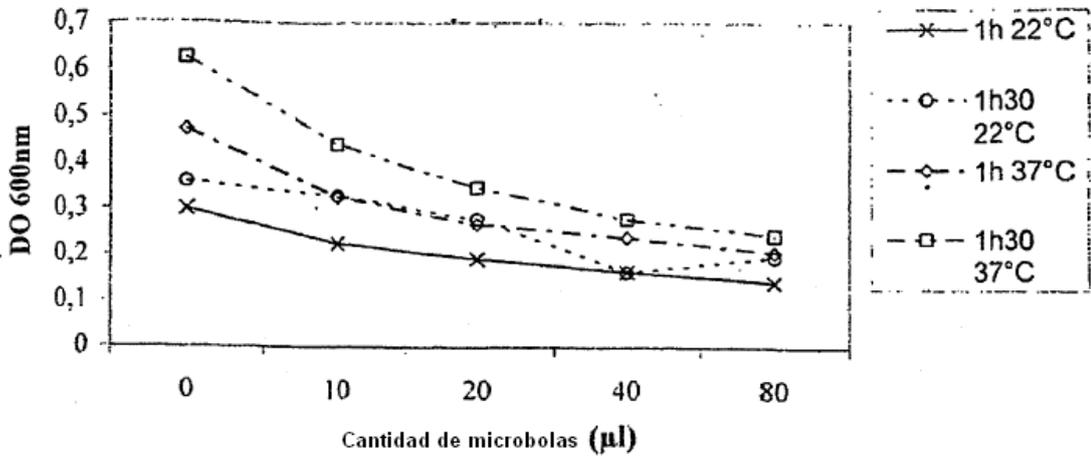


FIGURA 1

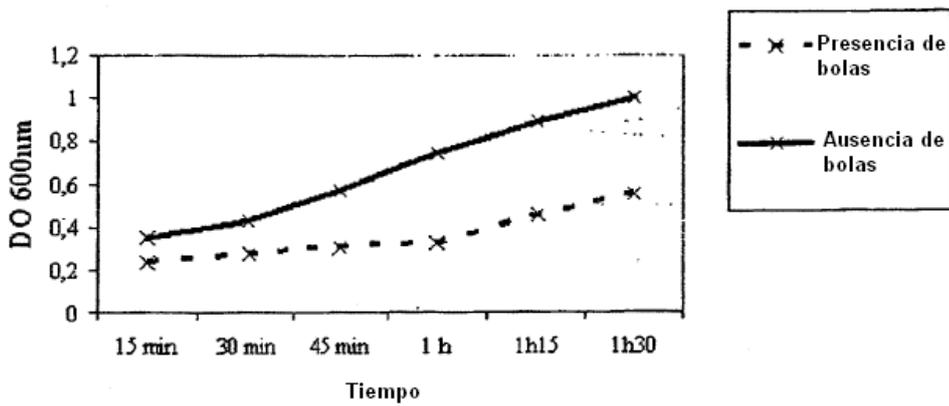


FIGURA 1A

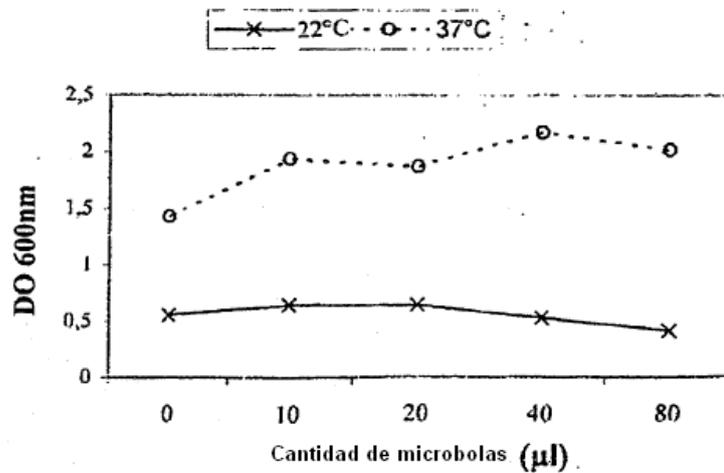


FIGURA 2

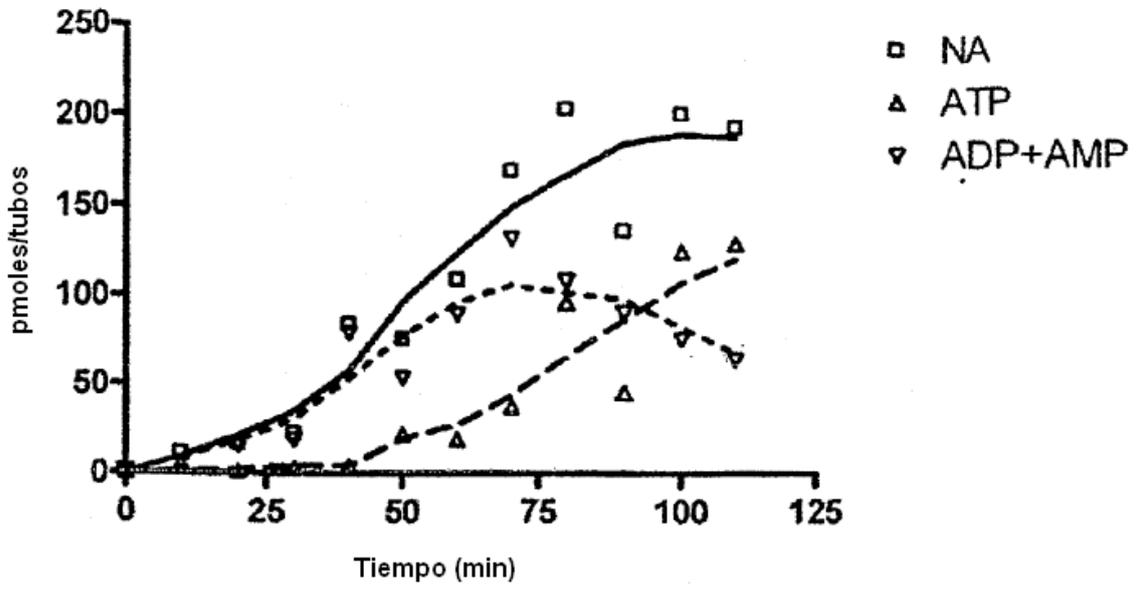


FIGURA 3

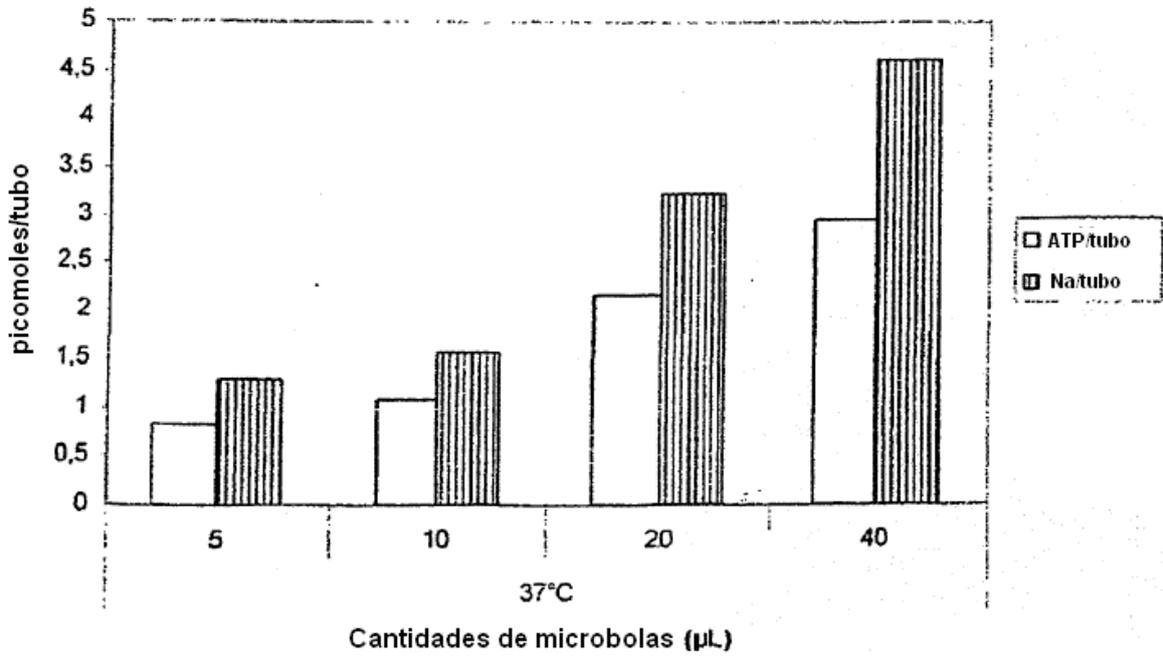


FIGURA 4

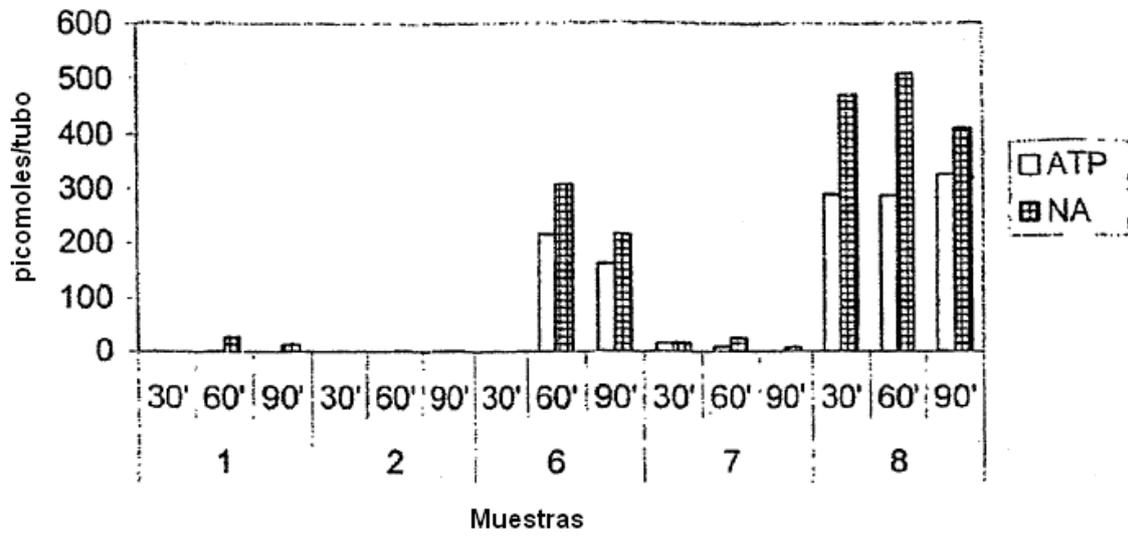
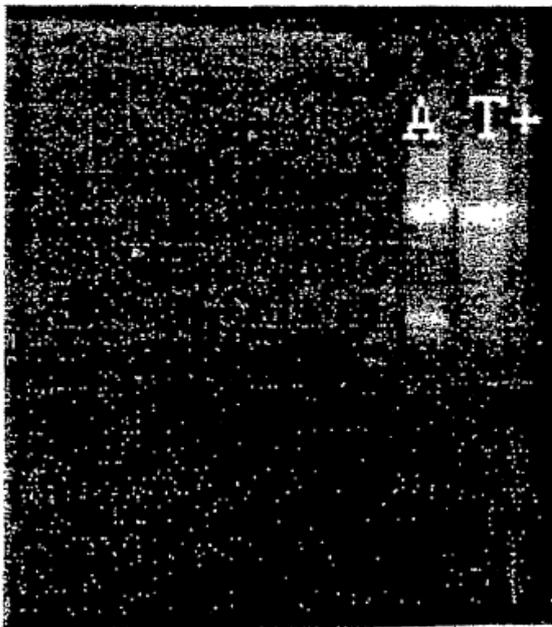


FIGURA 5



Leyendas:
A: muestra 7
T+: testigo positivo

FIGURA 6