

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 854**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2002 E 10013064 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2311934**

54 Título: **Detección rápida de células en replicación**

30 Prioridad:

06.09.2001 US 317658 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.11.2013

73 Titular/es:

**RAPID MICRO BIOSYSTEMS, INC. (100.0%)
One Oak Park Drive
Bedford, MA 01730, US**

72 Inventor/es:

STRAUS, DON

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 430 854 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

Detección rápida de células en replicación

Antecedentes de la invención

5 La invención se refiere a la detección, enumeración e identificación de células en replicación, especialmente células microbianas (por ejemplo, bacterias, levaduras y mohos), en muestras médicas, industriales y medioambientales. El cultivo microbiano es la metodología predominante en estos mercados, debido a sus muchas características atractivas. La invención aborda la desventaja principal del cultivo microbiano (el periodo de tiempo necesario para lograr resultados) mientras que conserva los atributos beneficiosos del método.

Cultivo microbiano para detectar y enumerar microbios

10 Durante los siglos XIX y XX, surgió una comprensión referente al papel de las bacterias, levaduras y mohos en la producción de enfermedades infecciosas y en la determinación de la calidad de alimentos y bebidas. Al principio, se desarrolló un método potente, el cultivo microbiano, para detectar pequeños números de microbios. El cultivo microbiano permite una detección visual sencilla de microbios aprovechándose de su propensión a reproducirse en grandes números rápidamente. Por ejemplo, una única célula bacteriana, que es demasiado pequeña para verse a simple vista (aproximadamente una millonésima de un metro), cuando se coloca en caldo nutritivo, puede hacer que el caldo se vuelva visiblemente turbio en menos de 24 horas.

Los documentos de la técnica anterior a modo de ejemplo relacionados con la invención pueden resumirse tal como sigue:

20 Vidon D.J. *et al.*, Journal of applied microbiology, vol. 90, n.º 6, junio de 2001, páginas 988-993, proporcionan un método basado en quimioluminiscencia simple para la enumeración rápida de microcolonias de *Listeria spp.*

Nelis H. *et al.*, Water air and soil pollution, vol. 123, n.º 1-4, octubre de 2000, páginas 43-52, dan a conocer la detección enzimática de coliformes y *Escherichia coli* en el plazo de cuatro horas.

25 Van Poucke S.O. *et al.*, Journal of microbiological methods, vol. 42, n.º 3, noviembre de 2000, páginas 233-244, dan a conocer la detección rápida de *Escherichia coli* y coliformes totales fluorescentes y quimioluminiscentes en filtros de membrana.

Además, Van Poucke S.O. *et al.*, Journal of applied microbiology, vol. 89, n.º 3, septiembre de 2000 (09-2000), páginas 390-396, dan a conocer una prueba de citometría en fase sólida de 210 min. para la enumeración de *Escherichia coli* en agua potable.

30 Además, Kroll R.G. *et al.*, Journal of applied bacteriology, vol. 66, n.º 2, 1989, páginas 161-168, proporcionan un método de recuento de pulso de luz láser para el recuento automático y sensible de bacterias teñidas con naranja de acridina.

Adicionalmente, Van Poucke S.O. *et al.*, Water supply 1999 GB, vol. 17, n.º 2, 1999, páginas 67-72, dan a conocer la detección enzimática basada en citometría en fase sólida de coliformes en agua potable en el plazo de 4 horas.

35 Una técnica de cultivo microbiano relacionada, denominada enumeración microbiana o recuento de colonias, cuantifica el número de células microbianas en una muestra. El método de enumeración microbiana, que se basa en la replicación microbiana *in situ*, proporciona generalmente una "colonia" *detectable visualmente* para cada célula microbiana en la muestra. Por tanto, el recuento de colonias visibles permite a los microbiólogos determinar el número de células microbianas en una muestra de manera precisa. Para realizar la enumeración microbiana, las células bacterianas pueden dispersarse sobre la superficie de agar nutritivo en placas de Petri ("placas de agar") e incubarse en condiciones que permiten la replicación bacteriana *in situ*. Los microbios individuales, *visualmente indetectables*, se replican repetidamente para crear un gran número de microbios hijos idénticos en el sitio físico en el que se depositó la célula microbiana progenitora. Las células hijas permanecen colocalizadas (esencialmente contiguas) con la célula original, de modo que la cohorte de células hijas (que puede crecer hasta decenas o centenas de millones de células) forma finalmente una colonia visible sobre la placa.

45 Se han desarrollado métodos electrónicos para enumerar colonias microbianas. La mayoría de tales métodos automatizan el recuento de colonias pero no aumentan sustancialmente la sensibilidad ni disminuyen el tiempo hasta conseguir resultados en comparación con la enumeración tradicional a simple vista. Los contadores de colonias usan una variedad de métodos ópticos para detectar colonias incluyendo la detección de propiedades ópticas intrínsecas de las microcolonias (por ejemplo, patente estadounidense n.º: 3.493.772; patente estadounidense n.º: 3.811.036; patente estadounidense n.º: 5.290.701; Arkin, A. P., *et al.* (1990); Biotechnology (N Y) 8: 746-9) y cambios de color de moléculas indicadoras del pH en la matriz que rodea a las colonias (patente estadounidense n.º 5.510.246). También se han desarrollado métodos que usan tinciones o sondas para marcar las colonias y se tratarán más adelante.

El cultivo microbiano es un método extraordinariamente satisfactorio, tal como se evidencia por el hecho de que

5 incluso tras más de un siglo, el método predomina todavía en microbiología médica y en las pruebas de control de calidad en microbiología industrial (por ejemplo, fabricación de productos farmacéuticos, alimentos y bebidas). El método es económico, relativamente sencillo y ultrasensible. La sensibilidad del cultivo microbiano puede observarse en la prueba común para patógenos transmitidos por alimentos en carne picada. Puede detectarse una única célula patógena bacteriana microscópica en 25 gramos de carne picada usando el cultivo microbiano. Otra ventaja del cultivo microbiano es su capacidad para detectar una gran variedad de microbios de importancia médica e industrial.

10 Una ventaja de la replicación bacteriana *in situ* es la capacidad para generar una población de células pura, o clonal (denominada cultivos puros, clones o colonias). Un cultivo puro es una gran colección de células vivas idénticas que desciende de la misma célula progenitora. Se requieren cultivos puros para métodos que identifican microbios y para determinar la resistencia a antibióticos. La microbiología médica se basa en gran medida en cultivos puros, dado que los patógenos bacterianos se aíslan frecuentemente de muestras clínicas no estériles (por ejemplo, heces o heridas) junto con bacterias no patógenas que probablemente son incluso más numerosas que la célula patógena. El aislamiento de cultivos microbianos puros es también importante en microbiología industrial. Por ejemplo, los fabricantes de productos farmacéuticos y cosméticos deben someter a prueba sus productos para detectar la presencia de contaminantes microbianos. Se usan cultivos puros de los microbios contaminantes para la identificación microbiana, lo que determina si un lote de producción debe desecharse y ayuda en la investigación de la fuente de la contaminación en el proceso industrial.

Enumeración microbiana usando cultivo microbiano	
Ventajas	
•	ultrasensible
•	cuantitativa
•	genera cultivos puros
•	puede detectar y enumerar muchos tipos de microbios en una única prueba
•	puede hacer crecer microbios selectivamente
•	sólo detecta células en replicación
•	económica
•	sencilla y fácil de realizar
Desventajas	
•	lenta
•	análisis y procedimientos manuales
•	no todos los microbios pueden cultivarse

Tabla 1.

20 La capacidad para cultivar microbios *selectivamente* es una herramienta esencial para la identificación microbiana y para determinar la resistencia y la sensibilidad a agentes antimicrobianos tales como antibióticos. El cultivo selectivo se aprovecha del hecho de que diferentes microbios requieren diferentes condiciones de crecimiento. Estas diferencias surgen del hecho de que las cepas de microbios difieren en su composición bioquímica debido a diferencias genéticas inherentes. Por ejemplo, un tipo de microbio podría ser capaz de crecer en medio nutritivo que contiene el azúcar sorbitol como única fuente de átomos de carbono para impulsar su crecimiento, mientras que otro tipo de microbio no puede hacerlo. El crecimiento selectivo es importante en la industria alimentaria. Por ejemplo, puede explorarse una muestra de alimento para detectar un patógeno alimentario particular, *Salmonella*, sembrando en placa la muestra sobre medios que permiten que crezca *Salmonella* pero no otros microbios alimentarios.

30 De manera similar, se usa el cultivo selectivo para determinar qué antibiótico es el más eficaz para destruir una cepa bacteriana aislada del líquido cefalorraquídeo de un niño con meningitis bacteriana. Se usa un cultivo bacteriano puro (derivado de una colonia clonal de una placa de agar nutritivo) para inocular medio de crecimiento que contiene diversos antibióticos a diversas concentraciones. Se determina la terapia con antibiótico óptima monitorizando la capacidad del microbio para crecer en presencia de los diversos antibióticos. La determinación de la sensibilidad y la resistencia a antibióticos mediante crecimiento selectivo sobre la superficie de medio de agar nutritivo sólido es otro

enfoque común. Por ejemplo, en el método de Kirby-Bauer, se colocan pequeños discos de papel de filtro impregnados con diferentes antibióticos sobre la superficie de placas de agar nutritivo recubiertas con un cultivo puro de bacterias de una muestra clínica. Un gradiente de antibiótico difunde radialmente hacia fuera desde el filtro. Las bacterias que son resistentes a altos niveles del antibiótico crecen hasta el borde del filtro. Sin embargo, las bacterias que son muy sensibles al antibiótico no pueden crecer a menos que estén lejos del borde del filtro. Tras incubar las placas (habitualmente durante uno o dos días), un microbiólogo determina el nivel de resistencia a un antibiótico midiendo el grosor del anillo libre de crecimiento o la zona alrededor del filtro. Un método relacionado, la prueba "E" (diagnóstico de Hardy), usa una tira rectangular que está impregnada con un gradiente de antibiótico. Se determina el nivel de resistencia bacteriana midiendo el punto en la tira con la mayor concentración de antibiótico cerca del cual las bacterias continúan replicándose.

La desventaja más seria del cultivo microbiano es que es lento-lleva tiempo generar el número de células requerido para la detección visual. El largo periodo de crecimiento requerido para el cultivo microbiano es un problema significativo tanto en la asistencia sanitaria como en la industria. Por ejemplo, debido a que se requieren días para cultivar e identificar el microbio que produce una infección sanguínea en un paciente, un paciente con una infección sanguínea fúngica podría morir antes incluso de que se inicie la terapia antifúngica. Algunos agentes infecciosos, tales como la bacteria que produce la tuberculosis, requieren generalmente semanas para crecer en cultivo. El largo tiempo requerido para detectar *M. tuberculosis* puede dar como resultado que un paciente con tuberculosis infecte a muchos otros de la enfermedad sumamente contagiosa o la cuarentena costosa de pacientes que no tienen tuberculosis.

En la fabricación de alimentos, los ciclos de pruebas largos pueden aumentar el deterioro de los alimentos o dar como resultado que material sometido a prueba de manera inadecuada avance hacia etapas de procesamiento posteriores. El cultivo microbiano lento también afecta de manera adversa a la producción de productos biofarmacéuticos y vacunas. En estas aplicaciones, el proceso de fabricación requiere a menudo la agrupación de lotes. Debido a los largos ciclos de pruebas del cultivo microbiano y a la necesidad de hacer avanzar el material a través del proceso de fabricación, algunas veces no se detectan lotes contaminados hasta después de una etapa de agrupamiento de lotes. Si se encuentra posteriormente que un lote contaminado se combinó con lotes no contaminados, todo el conjunto de lotes combinados debe desecharse.

Otras desventajas del cultivo microbiano, tales como los procedimientos manuales tediosos y la incapacidad para cultivar algunos microbios, se consideran menos problemáticas que el largo tiempo requerido. Por ejemplo, predominan métodos manuales para la enumeración microbiana, aún cuando se han introducido instrumentos para la siembra en placa y el análisis automatizados. La mayoría de los tipos de microbios encontrados en el medioambiente no pueden crecer en el laboratorio. Sin embargo, tales microbios a menudo no son perjudiciales para los seres humanos o son destruidos en procesos de fabricación industrial y por tanto se ignoran para la mayoría de las aplicaciones. Sin embargo, varias excepciones importantes de importancia médica crítica incluyen bacterias difíciles o imposibles de cultivar tales como *Chlamydia*, cuyas cepas pueden producir una enfermedad de transmisión sexual y neumonía. Afortunadamente, están disponibles en estos casos métodos alternativos independientes de cultivo (véase más adelante).

Métodos de enumeración rápida con cultivo bacteriano

Se han desarrollado varios métodos de cultivo microbiano para una enumeración microbiana más rápida (por ejemplo, patente estadounidense n.º: 4.587.213). Un método de cultivo microbiano rápido deposita células bacterianas sobre portaobjetos de microscopio recubiertos con medio nutritivo. Usando examen microscópico, puede detectarse el crecimiento microbiano mucho más pronto que a simple vista, dado que los microscopios pueden detectar microcolonias que resultan de un pequeño número de divisiones celulares. Sin embargo, este método no es eficaz para someter a prueba muestras grandes que contienen números bajos de células microbianas, porque sólo puede observarse un volumen muy pequeño de la muestra en un campo de visión microscópico. La baja sensibilidad de los métodos microscópicos limita generalmente su utilidad a muestras que contienen más de diez mil células bacterianas por mililitro (estos métodos son mucho menos sensibles que el cultivo microbiano tradicional).

El advenimiento de sistemas electrónicos de obtención de imágenes ha conducido al desarrollo de numerosos "contadores de colonias" automáticos. Aunque la mayoría de estos contadores están diseñados para ayudar al usuario automatizando el proceso de recuento de colonias y no disminuyen el tiempo hasta conseguir resultados, algunos sistemas han demostrado la capacidad para detectar colonias antes de que sean suficientemente grandes como para observarse fácilmente a simple vista. Por ejemplo, el contador de microcolonias rápido Colifast (Colifast) puede detectar colonias pequeñas marcadas de manera fluorescente de bacterias coliformes horas antes de que puedan observarse a simple vista. El sistema Colifast logra una detección potenciada usando un compuesto fluorogénico (una sustancia que no es fluorescente hasta que se metaboliza por bacterias coliformes) incluido en los medios de agar nutritivo.

Se ha comercializado recientemente un sistema para la enumeración rápida de colonias microbianas usando marcaje bioluminiscente. El sistema MicroStar (Millipore) usa el ATP celular en microcolonias para generar luz a través de la acción de sustratos y enzima luciferasa aplicados. El método reduce el tiempo hasta la detección sustancialmente. El sistema de obtención de imágenes MicroStar también se ha usado junto con sondas marcadas

para identificar bacterias específicas (Stender, H., *et al.* J Microbiol Methods 46: 69-75 (2001)). Una desventaja del sistema es que el método de detección destruye los microbios, impidiendo el aislamiento de cultivos puros a partir de las colonias. El sistema también requiere un módulo intensificador de imágenes caro.

5 Un método basado en película instantánea para detectar microcolonias que contienen bacterias específicas se ha desarrollado por Boston Probes (Perry-O-Keefe, H., *et al.* Journal of Applied Microbiology 90: 180-9 (2001)). Se marcan microcolonias microbianas sobre membranas usando sondas de ANP específicas de microbios marcadas con una enzima que puede generar una señal quimioluminiscente. Las membranas se colocan entonces sobre una película instantánea o de rayos X para la obtención de imágenes. El método se limita a la exploración para detectar un microbio particular en un experimento. Un método similar usa sondas de ANP marcadas de manera fluorescente y un escáner en red (Stender, H., *et al.* Journal of Microbiological Methods 45: 31-9 (2001)). Estos enfoques requieren sustancialmente más pericia que los métodos de cultivo tradicionales.

Enumeración microbiana rápida sin cultivo microbiano

15 Los métodos más rápidos para la enumeración microbiana renuncian al cultivo microbiano. Los microbiólogos industriales y médicos generalmente están interesados sólo en enumerar microbios viables -sólo los microbios vivos pueden replicarse durante el cultivo microbiano. Por tanto, para que sean más eficaces, los métodos que detectan células individuales sin dependencia de la replicación celular deben distinguir los microbios vivos de los muertos usando sustitutos fisiológicos para la replicación celular (por ejemplo, Nebe-von-Caron, G., *et al.*, J Microbiol Methods 42: 97-114., 2000; Mignon-Godefroy, K., *et al.*, Cytometry 27: 336-44, 1997). Las células se tiñen con colorantes que miden una propiedad bioquímica que está correlacionada generalmente con la capacidad para replicarse (por ejemplo, actividad esterasa o respiración bioquímica). La validación y el establecimiento de métodos sustitutos ha sido problemática ya que las muestras que se sabe que cumplen las normas reguladoras y que se puntúan como estériles usando métodos de cultivo en placa tradicionales a menudo tienen miles de células que puntúan positivo para la actividad bioquímica sustituta.

25 Un ejemplo de un sistema que detecta directamente células viables es el sistema ScanRDI (Chemunex). ScanRDI enumera células microbianas que están teñidas con un sustrato de esterasa fluorogénico usando tecnología de barrido láser (patente estadounidense n.º: 5.663.057; Mignon-Godefroy, K., *et al.*, Cytometry 27: 336-44, 1997). Un sistema de barrido láser (que incluye un sistema de recogida óptica que usa tubos fotomultiplicadores (PMTs)) captura una imagen del filtro y puede detectar células marcadas individuales. El sistema ilumina y consulta un área *microscópica* (generalmente de 4-14 μm) pero barre el haz progresivamente de modo que cubre un área *macroscópica* (por ejemplo, un círculo de 25 mm de diámetro). El sistema está diseñado para detectar células con membranas intactas y enzima esterasa activa. Hay una correlación entre los números de tales células y el número de células que pueden formar colonias en medio de crecimiento. Sin embargo, este enfoque da como resultado a menudo un "recuento excesivo" sustancial, es decir, un número de células superior al detectado mediante el cultivo tradicional (Costanzo, S., *et al.* (2002). PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 56: 206-219). Otra desventaja del sistema ScanRDI es que destruye los microbios durante el proceso de tinción impidiendo la generación de cultivos puros a partir de los microbios detectados. Finalmente, los sistemas de barrido láser para la enumeración celular son complejos y caros (cientos de miles de dólares), lo que hace difícil justificarlos para aplicaciones microbiológicas de rutina. Se han comercializado también otros sistemas de barrido láser (Miraglia, S., *et al.*, J Biomol Screen 4: 193-204, 1999; Tibbe, A. G., *et al.*, Nat Biotechnol 17: 1210-3, 1999; Kametsky, L., 2001, *Laser Scanning Cytometry*. En Cytometry, Z. Darzynkiewicz, H. Crissman y J. Robinsnon, eds. Methods in Cell Biology Vol. 63, parte A, 3ª ed, Series Eds. L. Wilson y P. Matsudaira. (San Diego: Academic Press)).

45 La citometría de flujo es otro método potente que puede enumerar rápidamente microbios sin basarse en la replicación celular (Alvarez-Barrientos, A., *et al.*, Clin Microbiol Rev 13: 167-195, 2000). Partículas u organismos individuales se fuerzan para que fluyan a través de un canal estrecho, uno cada vez, por delante de un haz de láser. Además de la enumeración, se recoge información sobre el tamaño/la forma y la composición analizando la emisión de fluorescencia y la dispersión de luz producida por los organismos. Pueden analizarse miles de partículas o células individuales por minuto. Pueden identificarse patógenos usando citometría de flujo mediante la unión a organismos fijados de sondas de ácido nucleico o anticuerpos específicos de especie marcados de manera fluorescente (Alvarez-Barrientos, 2000, *supra*).

50 Pueden identificarse patógenos usando citometría de flujo mediante la unión a organismos fijados de sondas de ácido nucleico o anticuerpos específicos de especie marcados de manera fluorescente (Alvarez-Barrientos, 2000, *supra*). Habitualmente, las dianas son células individuales de un tipo particular. Se han usado más extensamente métodos de citometría de flujo para detectar cuantitativamente tipos celulares particulares basándose en la capacidad para unirse a sondas marcadas, habitualmente o bien anticuerpos o bien ácidos nucleicos. Por ejemplo, se usa citometría de flujo para cuantificar los tamaños de poblaciones de clases de linfocitos en pacientes con SIDA. La citometría de flujo es un método más complejo y caro que el cultivo tradicional. Aunque más rápido que el cultivo tradicional, la citometría de flujo no tiene un límite de detección comparable al método tradicional. El cultivo microbiano tradicional puede detectar una célula bacteriana en 0,1 litros de agua, mientras que la citometría de flujo es lo más eficaz cuando está a niveles que son muchos miles de veces superiores a eso. Además, las dianas microbianas se destruyen a menudo por los métodos de tinción usados para la detección, eliminando la capacidad para producir cultivos puros.

El uso de la obtención de imágenes microscópicas para visualizar y enumerar microorganismos directamente puede ser rápido y relativamente sencillo de realizar (Amann, R. I., *et al.*, Microbiological Reviews 59: 143-69, 1995). Los ensayos de fluorescencia directa (DFA) en los que un anticuerpo marcado de manera fluorescente reacciona con una muestra fijada son un método común en laboratorios de diagnóstico clínico. Por ejemplo, muestras que se sospecha que contienen agentes bacterianos se tiñen rutinariamente con tinción de Gram. De manera similar, para someter a prueba para detectar *M. tuberculosis*, las muestras se someten a tinción acidorresistente. La desventaja de esta técnica es que es muchos miles de veces menos sensible que el cultivo microbiano. La baja sensibilidad se debe a los pequeños campos visualizados a un aumento alto. Sólo a altas concentraciones de células diana es probable que los pequeños campos contengan una célula diana. Por tanto, por ejemplo, la identificación fiable de patógenos bacterianos en esputos usando hibridación *in situ* fluorescente requiere títulos de aproximadamente 4×10^5 células/ml o más. Las muestras clínicas obtenidas en infecciones comunes médicamente significativas pueden contener menos de 100 células/ml, una concentración que no es ni con mucho lo suficientemente alta como para esperar encontrar una célula en un campo microscópico de alta potencia.

Se ha desarrollado un sistema que tiene la sensibilidad para detectar células bacterianas únicas usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas por investigadores de Hamamatsu Corporation (Masuko, M., *et al.*, FEMS Microbiol Lett 67: 231-8, 1991; Masuko, M., *et al.*, FEMS Microbiol Lett 65: 287-90, 1991; Yasui, T., *et al.*, Appl Environ Microbiol 63: 4528-33, 1997). La obtención de imágenes de grandes áreas de células diana microscópicas individuales se logra usando una cámara de CCD de recuento de fotones ultrasensible acoplada a un sistema de fibra óptica, un intensificador de imágenes y un procesador de imágenes. Una desventaja de este sistema es el gran gasto en que se incurre debido a la incorporación del intensificador de imágenes y la óptica asociada. Además, a diferencia de los métodos de cultivo microbiano, el sistema no puede detectar *ningún* microbio, distinguir entre microbios vivos y muertos ni generar cultivos puros.

Enumeración microbiana rápida cuantificando constituyentes moleculares de células

En el último medio siglo se han desarrollado numerosos métodos para detectar e identificar microbios basados en sus constituyentes moleculares. Aunque algunos de estos métodos son sustancialmente más rápidos que el cultivo microbiano, ninguno ofrece todas las características del cultivo que son críticas para los microbiólogos. Por ejemplo, aunque se han comercializado numerosos inmunoensayos para microbios, esta técnica no es inherentemente cuantitativa, es mucho menos sensible que el cultivo microbiano y no es tan potente como el cultivo para detectar muchos tipos de microbios en una única prueba. O, como otro ejemplo, los métodos de amplificación de ácido nucleico pueden ser tan sensibles como el cultivo microbiano, pero no distinguen entre células vivas y no vivas y no pueden suministrar cultivos puros para pruebas de sensibilidad a antibióticos. Los métodos para análisis bioquímico (por ejemplo, de ácidos grasos, ácidos nucleicos o proteínas) usando electroforesis, espectrometría de masas y cromatografía pueden ser potentes para la identificación microbiana, pero habitualmente tales métodos son inapropiados para la enumeración microbiana y generalmente son demasiado caros y complejos para el diagnóstico microbiano de rutina.

Necesidades no cumplidas para la enumeración microbiana

En resumen, las pruebas de enumeración microbiana actuales están dominadas por el cultivo microbiano. El cultivo microbiano tiene las importantes ventajas de ser sencillo, ultrasensible, económico y cuantitativo pero tiene la desventaja significativa de ser lento. El largo tiempo requerido para obtener resultados tiene costes importantes en la asistencia sanitaria y la fabricación. Se han desarrollado métodos más rápidos, pero aunque mejoran el tiempo hasta conseguir resultados, han sacrificado una o más de las ventajas críticas del cultivo microbiano.

Por tanto, hay una necesidad de una prueba que sea más rápida que el cultivo microbiano tradicional pero que conserve los beneficios clave del método tradicional.

Sumario de la invención

La invención permite la enumeración eficaz, rápida y sensible de células vivas mediante la detección de colonias microscópicas que provienen de la división celular *in situ* usando obtención de imágenes de grandes áreas. Las pruebas de enumeración microbiana basadas en la invención abordan un problema importante en la microbiología clínica e industrial (el largo tiempo necesario para la detección de las pruebas tradicionales) mientras que conservan ventajas clave de los métodos tradicionales basados en cultivo microbiano. Los métodos dados a conocer en el presente documento incluyen métodos asépticos no destructivos para detectar microcolonias celulares sin reactivos de marcaje. Estos métodos permiten la generación de cultivos puros que pueden usarse para la identificación microbiana y la determinación de la resistencia antimicrobiana.

La invención ofrece métodos para detectar células diana vivas tal como se definen en las reivindicaciones.

La invención o divulgación, respectivamente, muestra un método para detectar células diana vivas en una muestra que incluye las etapas de proporcionar células diana vivas presentes en la muestra en una zona de detección que incluye un área de detección a una densidad inferior a 100 células diana por mm^2 del área de detección, permitir la formación de una o más microcolonias de las células diana mediante replicación *in situ*; y detectar una o más microcolonias; en el que la dimensión lineal más larga del área de detección es mayor de 1 mm; dentro del área de

detección, las células están dispersadas e inmovilizadas al azar; la detección detecta una o más microcolonias que tienen una medida media inferior a 50 micras en al menos dos dimensiones ortogonales; y las células en la una o más microcolonias siguen siendo competentes para replicarse tras la etapa de detección.

5 La invención o divulgación, respectivamente, muestra adicionalmente un método para detectar microcolonias de células diana que incluye las etapas de proporcionar células diana en una zona de detección, en el que dentro del área de detección, las células están dispersadas e inmovilizadas al azar; permitir la formación de una o más microcolonias de las células diana mediante replicación *in situ*, en el que al menos una de la microcolonias incluye menos de 100 células diana; y detectar una o más propiedades ópticas que se producen de manera natural de la una o más microcolonias usando un aumento de menos de 5 veces.

10 La descripción también muestra un instrumento para detectar microcolonias de células diana que incluye un detector de matriz fotoeléctrica que tiene una resolución óptica de menos de 20 micras y valores de energía circunscrita superiores al 70% por píxel; una fuente de iluminación, en el que el instrumento puede iluminar y obtener imágenes simultáneamente de un área de detección que tiene al menos una dimensión que es ≥ 1 cm, y en el que el instrumento no aumenta ópticamente más de 5 veces.

15 **Ventajas de la invención**

En la tabla 2 se enumeran algunas ventajas de diversas realizaciones de la invención o divulgación, respectivamente.

Realización	Ventajas
<ul style="list-style-type: none"> Enumeración y detección fluorescente sin reactivos de microcolonias 	<ul style="list-style-type: none"> - Cambios mínimos con respecto a prácticas aceptadas - Trayectoria reguladora más rápida y con menos riesgos - Bajo coste de los artículos - Simplicidad del sistema - Permite pruebas no destructivas (más adelante)
<ul style="list-style-type: none"> Óptica de recogida optimizada para detectar microcolonias vivas 	<ul style="list-style-type: none"> - Corto tiempo hasta la detección
<ul style="list-style-type: none"> Obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas de microcolonias vivas individuales sobre membranas 	<ul style="list-style-type: none"> - Permite una detección ultrasensible - Permite un amplio intervalo dinámico - Permite amplio intervalo de volúmenes de muestra - Razón señal:fondo alta a bajos títulos
<ul style="list-style-type: none"> Enumeración no destructiva (es decir, los microbios no se destruyen) 	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la generación de cultivos puros - Permite la identificación microbiana - Permite la detección de resistencia antimicrobiana - Permite la validación interna (a continuación)
<ul style="list-style-type: none"> Comparación interna con colonias visibles tradicionales 	<ul style="list-style-type: none"> - Racionaliza la demostración de equivalencia con respecto a métodos validados
<ul style="list-style-type: none"> Obtención de imágenes de microcolonias vivas en elementos desechables estériles (cerrados) 	<ul style="list-style-type: none"> - Permite múltiples lecturas - Minimiza los falsos positivos
<ul style="list-style-type: none"> Métodos y software que diferencian únicamente microbios en crecimiento de artefactos 	<ul style="list-style-type: none"> - Robustez de detección añadida, especificidad - Permite la detección en muestras complejas

Tabla 2

20 El corto periodo de tiempo de la invención necesario para lograr resultados proviene de la capacidad de la invención para detectar microcolonias que contienen sólo una pequeña fracción de las células que se requieren por los

métodos tradicionales. Dado que la replicación celular requiere tiempo, la detección de microcolonias pequeñas usando la invención proporciona resultados más rápidos que la detección de colonias visibles más grandes usando métodos de enumeración tradicionales. Para detectar microcolonias pequeñas, la invención usa una combinación de métodos de generación de señales y detección de señales eficaces.

5 La ultrasensibilidad (su capacidad para detectar pequeños números de células microscópicas en grandes muestras) proviene, en parte, del uso de obtención de imágenes de grandes áreas. Por ejemplo, la invención puede detectar colonias microscópicas *sin aumento*. Esta característica permite que se inspeccione una gran área para detectar microcolonias en una única imagen. La obtención de imágenes de una gran área es una clave de la capacidad de la invención para analizar eficazmente grandes volúmenes de muestra. Por ejemplo, pueden depositarse los
10 contaminantes microbianos en un gran volumen de una muestra sobre una membrana usando filtración por membrana. La invención, usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas de microcolonias, puede analizar toda la membrana eficazmente. En cambio, el uso de un microscopio de alto aumento para evaluar las microcolonias en el mismo filtro podría requerir miles de imágenes.

15 La potencia para enumerar pequeños números de microcolonias en una gran área eficazmente también procede de la capacidad de la invención para usar enfoques de obtención de imágenes que comparan señales de objetos con fondos locales. Esta capacidad mejora la razón de señal con respecto al fondo para muestras que contienen pocas células con respecto a métodos que integran el fondo y la señal totales en una gran área.

20 La robustez del ensayo para muestras con pocas células se proporciona mediante la capacidad inherente de la invención para enumerar microcolonias en crecimiento. Por tanto, la invención puede disminuir los falsos positivos con respecto a métodos que detectan una única señal integrada, tales como métodos que cuantifican la presencia de biomoléculas (por ejemplo, ATP, antígenos o ácidos nucleicos). Cualquier artefacto que produzca una señal puede generar un falso positivo cuando se usan métodos que dependen únicamente de una señal integrada. Considérese una muestra que contiene 482 células microbianas cada una de las cuales genera 100 unidades de fluorescencia. El resultado de un método de integración es un único número (48.200 unidades de fluorescencia).
25 Artefactos que generan un número similar de unidades de fluorescencia, por ejemplo, una gran partícula de polvo fluorescente, pueden ser indistinguibles. Sin embargo, la invención puede distinguir fácilmente entre una única partícula de polvo fluorescente de polvo grande y 482 microcolonias en crecimiento individuales.

30 La detección de microcolonias en crecimiento es un método potente para diferenciar señales falsas positivas de objetos inanimados y células que no pueden crecer en las condiciones de prueba. Por ejemplo, considérese una prueba para detectar microcolonias microbianas en una membrana que se encuentra sobre medios de crecimiento sólidos en una placa de Petri. En una realización de la invención, se toman imágenes del área de detección antes de permitir que los microbios en el área de detección crezcan para dar microcolonias. Si están presentes algunas partículas de polvo fluorescentes o células de mamífero autofluorescentes en el área de detección, serán evidentes algunas señales positivas en esta imagen a "tiempo cero". Tras incubar la placa de Petri para permitir la replicación microbiana, se toma otra imagen. Cuando se alinean las dos imágenes en el registro, las señales positivas que corresponden a las microcolonias pueden distinguirse de los falsos positivos dado que los falsos positivos están presentes (habitualmente sin cambios) en la imagen a "tiempo cero" y en la imagen tras la incubación. Sólo las microcolonias en crecimiento deben aparecer a lo largo del tiempo. Para confirmar las señales de microcolonias, pueden obtenerse las imágenes y compararse a múltiples puntos de tiempo durante la incubación. Sólo las
40 microcolonias en crecimiento deben aumentar en tamaño y en intensidad de la señal a lo largo del tiempo.

45 Las pruebas construidas usando la invención pueden tener un gran intervalo dinámico en comparación con pruebas construidas usando métodos de la técnica anterior. Por tanto, por ejemplo, una prueba basada en la invención diseñada puede detectar desde una hasta 10^6 microcolonias en una única imagen. En cambio, los métodos de enumeración microbiana tradicionales funcionan mejor cuando se depositan de aproximadamente 30 a 150 colonias sobre un filtro (de 47 mm de diámetro). Los nuevos métodos de enumeración (por ejemplo, ScanRDI de Chemunex y MicroStar de Millipore) tienen también intervalos dinámicos limitados.

50 Para lograr una generación de señales eficaz, la divulgación o invención, respectivamente, puede aprovecharse o bien de las propiedades ópticas intrínsecas de las microcolonias (por ejemplo, autofluorescencia, reflectancia o dispersión de luz) o bien de diversos reactivos de marcaje aplicados de manera externa. La capacidad para aprovecharse de una variedad de propiedades ópticas y métodos de marcaje permite la creación de pruebas microbiológicas importantes. Por ejemplo, el uso de un método que detecta una propiedad ubicua de las microcolonias (por ejemplo, autofluorescencia o absorción de infrarrojos) es útil para pruebas que enumeran el contenido microbiano total de una muestra. Tales pruebas son críticas en el procesamiento de alimentos para determinar la posibilidad de deterioro y para pruebas de liberación de productos terminados en la fabricación farmacéutica. Una alternativa importante dada a conocer en el presente documento usa un sistema sin reactivos
55 basado en la detección de autofluorescencia celular para detectar microcolonias microbianas pequeñas. Esta alternativa proporciona un enfoque sencillo, no destructivo, aséptico para la enumeración microbiana. Para detectar tipos de células específicos, pueden usarse reactivos de marcaje específicos de categoría. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo marcado de manera fluorescente que se une específicamente a *Listeria monocytogenes* para
60 detectar microcolonias que provienen de células de este importante patógeno alimentario.

- Como el cultivo microbiano tradicional, la invención puede aprovecharse de la potencia diagnóstica de medir el crecimiento microbiano en condiciones selectivas. Por ejemplo, para determinar la resistencia bacteriana a antibióticos, pueden hacerse crecer bacterias en medio de crecimiento sobre el que se han colocado discos con antibióticos. El tamaño de la zona sin crecimiento cerca de los discos determina la resistencia a antibióticos. La invención puede usarse para detectar el tamaño de esta zona más rápidamente. De manera similar, la invención puede usarse para detectar el crecimiento de microbios específicos en medio selectivo rápidamente.
- La simplificación del ciclo de validación de la prueba obligatorio en el que se muestra que un método nuevo es equivalente al "método de referencia" es otra ventaja de la invención que proviene de la enumeración no destructiva. La invención facilita la equivalencia con respecto a las pruebas de cultivo como "método de referencia" permitiendo una comparación interna de los métodos nuevo y antiguo. En resumen, tras obtener imágenes de las microcolonias que provienen de microbios en una muestra en un punto de tiempo temprano, pueden volver a incubarse las muestras durante la cantidad de tiempo requerida cuando se usa detección visual tradicional de colonias. De esta forma, puede realizarse una comparación interna entre la enumeración de las microcolonias de la invención y la enumeración *de las mismas colonias en un tiempo posterior* mediante el método tradicional.
- Otras características y ventajas resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones.
- Por célula diana se quiere decir una célula que está potencialmente presente en una muestra y cuya presencia se somete a ensayo mediante la invención.
- Por categoría de células diana se quiere decir múltiples células diana que se consideran idénticas para los fines de una prueba construida usando la invención.
- Considérese una prueba diseñada para detectar cualquier cepa de bacterias *E. coli*. Para los fines de la prueba, la categoría "*E. coli*" incluiría por tanto cualquier bacteria de la especie *E. coli*. Una prueba de este tipo podría diseñarse para detectar, sin diferenciación, cualquier bacteria de la especie *E. coli*. Las bacterias y otras células diana que no son *E. coli* o bien no se detectarían en esta prueba o bien se detectarían e identificarían como que no son miembros del grupo *E. coli*. En cambio, considérese una prueba diseñada para detectar el patógeno *E. coli* O157:H7, un subgrupo de la especie *E. coli*. El este caso, el subgrupo *E. coli* O157:H7 es una categoría de células diana. Las bacterias del subgrupo, es decir, de la categoría "*E. coli* O157:H7", se detectan sin diferenciación. Las *E. coli* que no están en el subgrupo *E. coli* O157:H7 no se detectan mediante la prueba y por tanto no están en la categoría *E. coli* O157:H7.
- No es necesario que las categorías estén relacionadas taxonómicamente como en el párrafo anterior. Por ejemplo, podría diseñarse una prueba para detectar la categoría de bacterias que produce una proteína que se requiere para conferir resistencia al antibiótico vancomicina. Esta proteína podría producirse por cepas bacterianas que no están relacionadas estrechamente, es decir, que son miembros de especies dispares. Sin embargo, una cepa resistente a vancomicina de una especie es probable que esté relacionada muy estrechamente con cepas sensibles a vancomicina de la misma especie. La categoría de bacterias que producen la proteína vanA (importante para lograr resistencia a vancomicina), por ejemplo, incluye bacterias resistentes a vancomicina del género *Enterococcus* y del género *Staphylococcus*, mientras que la mayoría de los enterococos y estafilococos no están incluidos en la categoría. Por tanto, en este caso, puede observarse que la categoría abarca células diana que se considera, para los fines de la prueba, que son idénticas debido a una característica común, en este caso un componente molecular (un sitio de unión específico de categoría) en vez de una relación filogenética común (genealógica).
- Por categorías no solapantes de células diana se quiere decir grupos de células diana cuya unión es el conjunto nulo. Es decir, la categoría de todas las bacterias *E. coli*, la categoría de todas las bacterias del género *Pseudomonas* y la categoría de todos los hongos son categorías no solapantes. Es decir, ningún miembro de ninguna de las categorías es un miembro de ninguno de los otros grupos.
- Por complejidad categórica de una prueba se quiere decir el número de categorías no solapantes que se detectan en la prueba.
- Por sitio de unión específico de categoría se quiere decir un sitio en una célula diana que se *une específicamente* a una molécula de unión a una categoría en *condiciones de unión específicas* y que distingue células diana que son miembros de una categoría particular que va a identificarse en una prueba de células diana que no son miembros de esa categoría pero que podrían estar presentes también en la muestra de prueba. Es decir, el sitio está presente normalmente en todos los miembros de una categoría, y normalmente no está en ningún miembro de categorías no solapantes. Los sitios de unión específicos de categoría se *unen específicamente a moléculas de unión específicas de categoría*.
- Si una prueba explora una muestra para detectar una categoría de células diana que constituye un grupo taxonómico, un sitio de unión específico de categoría es uno que está presente en esencialmente todos los miembros de ese grupo taxonómico, pero que no está presente en esencialmente todos los miembros de otros grupos taxonómicos que podrían estar presentes en la muestra de prueba.
- Alternativamente, una prueba podría explorar una muestra para detectar sitios de unión específicos de categoría que

son compartidos por miembros de diferentes grupos taxonómicos. Ejemplos de este tipo de sitio de unión específico de categoría incluyen diversas macromoléculas (por ejemplo, ADN) y genes, ARNm y proteínas que confieren resistencia a antibióticos, confieren virulencia o indican viabilidad. Un sitio de unión específico de categoría es a menudo una parte de un complejo o molécula más grande. Por ejemplo, puede usarse una secuencia genómica específica de categoría como sitio de unión específico de categoría en una prueba. Un sitio de unión específico de categoría de este tipo es parte de un genoma mucho más grande que contiene (1) secciones que no son específicas de categoría; (2) secciones que son sitios de unión específicos de categoría pero que la prueba no explora; y (3) otras secciones que son secuencias específicas de categoría distintas que la prueba explora.

Los sitios de unión que están presentes, por ejemplo en el 80%, 90%, 95%, o más del 99% de las células diana que son miembros de una categoría pero que están ausentes, por ejemplo, en el 80%, 90%, 95%, o más del 99% de las células diana que son miembros de todas las otras categorías de la misma clase, se consideran sitios de unión específicos de categoría. Obsérvese que un sitio de unión específico de categoría puede estar ausente trivial o excepcionalmente de una célula diana que es un miembro de la categoría. De manera similar, un sitio de unión específico de categoría puede estar presente trivial o excepcionalmente en una célula diana que no es un miembro de una categoría. Por ejemplo, considérese un sitio proteico que se produce esencialmente en todas las bacterias *E. coli* pero en ninguna otra especie bacteriana. Si, como podría ser el caso en menos de una célula entre millones de bacterias, una mutación hace que no se produzca la proteína, el marcador no estará presente en esa cepa de *E. coli*. Sin embargo, este sitio proteico se considera todavía un sitio de unión específico de categoría. Alternativamente, el gen para la misma proteína se transfiere a una cepa de una especie diferente de bacterias mediante tecnología de ADN recombinante o por medios naturales (por ejemplo, mediante transducción viral). En este caso, una cepa bacteriana que no es un miembro de la categoría *E. coli* expresaría lo que se consideraría todavía un sitio de unión específico de *E. coli*.

Por molécula de unión a una categoría se quiere decir una molécula o complejo molecular que se une específicamente a un sitio de unión específico de categoría. Ejemplos de moléculas de unión a una categoría son sondas de ácido nucleico que hibridan con ADN genómico; aptámeros de ácido nucleico que se han seleccionado o "evolucionado" *in vitro* para unirse específicamente a sitios en proteínas; anticuerpos que se unen a antígenos celulares o proteínas séricas; y ligandos tales como factor de crecimiento epidérmico o biotina que se unen específicamente a receptores de hormonas o a moléculas de unión, tales como avidina. Se dice que dos moléculas de unión a una categoría son distintas si se unen a sitios de unión específicos de categoría distintos y no solapantes. Puede hacerse referencia a moléculas de unión a una categoría según su composición molecular, por ejemplo, un ligando, anticuerpo, sonda, oligonucleótido, etc. de unión a una categoría.

Por una molécula de unión a una categoría que se une específicamente a una categoría de células diana se quiere decir una molécula de unión a una categoría que se une en condiciones de unión definidas a esencialmente todas las células diana que son miembros de una categoría explorada por una prueba, pero a esencialmente ninguna célula diana que no es miembro de la categoría pero que es probable que esté presente en la muestra. El número de moléculas de unión a una categoría que se unen a células diana en una categoría explorada en comparación con el número unido a células diana que no están en una categoría de ese tipo, es normalmente de dos veces, cinco veces, diez veces o mayor de cincuenta veces mayor.

Por condiciones de unión se quiere decir las condiciones usadas en una prueba para lograr una unión específica de moléculas de unión a una categoría a sitios de unión específicos de categoría. Por ejemplo, cuando las moléculas de unión a una categoría son sondas de ADN específicas de categoría, las condiciones de unión para una prueba particular podrían ser condiciones de hibridación de ADN rigurosas. Las condiciones de hibridación de ADN rigurosas apropiadas dependen de la naturaleza de las sondas, tal como conocen bien los expertos en la técnica. Por ejemplo, para sondas de ADN típicas de longitud mayor de 500 bases, una condición de unión apropiada (denominada habitualmente "condición de lavado" en la hibridación nativa) es de 65°C a 0,2X SSC. Para unir un anticuerpo a un antígeno, condiciones de unión típicas son temperatura ambiente en PBS-TB.

Por una familia de moléculas de unión a una categoría se quiere decir un grupo de moléculas de unión a una categoría que se unen específicamente a una categoría particular de células diana.

Los anticuerpos policlonales constituyen generalmente familias de moléculas de unión a una categoría dado que generalmente comprenden múltiples moléculas de unión a una categoría distintas que se unen a la misma categoría de la célula diana. Obsérvese que, a menos que se use purificación por afinidad, las preparaciones de anticuerpos policlonales contienen también normalmente anticuerpos que no se unen a la categoría elegida de célula diana y que pueden contener anticuerpos que se unen a otras categorías. Están presentes anticuerpos adicionales porque el repertorio de anticuerpos de un animal está determinado por la historia de infecciones del animal. Por tanto, los anticuerpos policlonales se purifican preferiblemente mediante métodos de afinidad. Las moléculas de unión a una categoría en una familia podrían unirse a algunas células diana en la categoría pero no a otras.

Otro ejemplo de una familia de moléculas de unión a una categoría es un grupo de 80 secuencias de ADN genómico específicas de categoría que se producen en todas las cepas de *E. coli* O157:H7 pero que no se producen en miembros de otros grupos de bacterias. Esta familia de moléculas de unión a una categoría pueden hibridar como un grupo con células *E. coli* O157:H7 adecuadamente preparadas, pero no hibridan con otras categorías de células.

Las familias pueden incluir diferentes tipos de moléculas de unión a una categoría. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno O157 y uno que se une a la proteína *intimina* (un factor de virulencia) podrían incluirse también en la familia anterior de moléculas de unión a una categoría. Una familia de moléculas de unión a una categoría puede comprender cualquier número de moléculas de unión a una categoría (es decir, una o más).

Por familias no solapantes de moléculas de unión a una categoría se quiere decir familias de moléculas de unión a una categoría en las que cada familia se une específicamente a una, y sólo una, categoría en un grupo de categorías no solapantes. Es decir, un grupo de familias no solapantes de moléculas de unión a una categoría delimita un grupo congruente de categorías no solapantes. Por ejemplo, en una prueba que explora los 4 organismos objetables para la USP, *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus aureus*, hay cuatro categorías no solapantes. Una prueba de este tipo podría incorporar cuatro anticuerpos policlonales que no reaccionan de manera cruzada diferentes, cada uno específico para una de las categorías de prueba. Por tanto, la prueba comprende cuatro familias no solapantes de moléculas de unión a una categoría. Las familias no solapantes de moléculas de unión a una categoría en una prueba se denominan un conjunto de moléculas de unión a una categoría.

Por un conjunto de moléculas de unión a una categoría se quiere decir un grupo de una o más familias no solapantes de moléculas de unión a una categoría que se combinan en una mezcla para una prueba particular. Las pruebas que exploran para detectar múltiples categorías no solapantes de células diana comprenden una familia de moléculas de unión a una categoría por categoría. Todo el grupo de moléculas de unión a una categoría, que comprenden estas familias, se denomina conjunto.

Por la complejidad de molécula de unión a una categoría de un conjunto se quiere decir el número de restos o moléculas de unión a una categoría distintos en un conjunto. Por ejemplo, si un conjunto de moléculas de unión a una categoría consiste en 234 sondas oligonucleotídicas, la complejidad de molécula de unión a una categoría del conjunto sería de 234.

Por la complejidad de familia de un conjunto se quiere decir el número de familias no solapantes de moléculas de unión a una categoría en un conjunto. La complejidad de familia es la misma que el número mínimo de células diana requerido para unirse a una molécula de unión a una categoría de cada una de las familias de un conjunto. La complejidad de familia de una prueba corresponde a la complejidad categórica de una prueba, es decir, el número de categorías distintas para las que se explora la muestra. En general, la complejidad de familia corresponde también al número de firmas de señal distintas usadas en una prueba.

Por elemento de señal se quiere decir una molécula o partícula que genera directamente una señal detectable. La frase "genera directamente" se refiere al hecho de que los elementos de señal son la fuente inmediata o el modulador crítico de la señal detectable. Por tanto, si la señal son fotones que surgen de un fluoróforo, el fluoróforo es la fuente inmediata de los fotones y, por tanto, es un elemento de señal. Si la señal son fotones dispersados por una partícula de RLS, la partícula de RLS es un elemento de señal. Alternativamente, si la señal es la luz transmitida o dispersada a partir de un producto precipitado cromogénico de la enzima peroxidasa del rábano, el producto cromogénico es el elemento de señal.

Una característica de un elemento de señal es que un elemento de este tipo no puede dividirse en partes de manera que cada parte genere una señal que es comparable (en carácter, no necesariamente en intensidad) a la totalidad. Por tanto, un punto cuántico de 2 nM de diámetro es un elemento de señal, ya que al dividirlo cambia el carácter (espectro de emisión) de los nanocristales resultantes. Una partícula de 5 µm impregnada con un colorante fluorescente tal como fluoresceína no es un elemento de señalización, dado que podría dividirse en partes de manera que cada parte tenga características de señalización comparables a la partícula intacta. La molécula fluoresceína, en cambio, es un elemento de señalización. Los productos detectables de enzimas que generan señales (por ejemplo, luciferasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano) se consideran también elementos de señal. Tales elementos de señal (o sus precursores cuando hay una conversión química de un precursor en un elemento de señal) pueden ser sustancias difusibles, productos insolubles y/o intermedios inestables. Por ejemplo, la enzima fosfatasa alcalina convierte el sustrato quimioluminiscente CDP-Star (NEN; número de catálogo NEL-601) en un producto activado, que es un elemento de señal emisor de fotones.

Por resto de señalización se quiere decir una molécula, partícula o sustancia que comprende o produce (en el caso de enzimas) uno o más elementos de señal y que está o puede estar conjugado con una molécula de unión a una categoría. El resto de señalización puede unirse a la molécula de unión a una categoría o bien covalentemente o bien no covalentemente y o bien directa o bien indirectamente (por ejemplo, mediante uno o más restos "conectores químicos" o adaptadores). Ejemplos de restos de señalización incluyen puntos cuánticos carboxilados; un fluoróforo tal como Rojo Texas que se modifica para unirse a una sonda de ácido nucleico o a una sonda de anticuerpos; partículas de poliestireno fluorescentes recubiertas con estreptavidina (que pueden conjugarse con proteínas de unión específicas de categoría biotiniladas); un producto de replicación en círculo rodante que contiene secuencias de ácido nucleico repetidas cada una de las cuales puede hibridar con varios oligonucleótidos con colas de nucleótidos modificados de manera fluorescente y que contiene un oligonucleótido de unión específico de categoría en el extremo 5'. Un resto de señalización puede comprender elementos físicamente distintos. Por ejemplo, en

algunos casos el resto de señalización es una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina) que está conjugada a una molécula de unión a una categoría (un anticuerpo, por ejemplo). La señal se genera cuando un sustrato de fosfatasa alcalina (por ejemplo, CDP-Star, o BM púrpura de NEN y Roche, respectivamente) se convierte en productos que son elementos de señal (por ejemplo, un intermedio inestable que emite un fotón, o un producto cromogénico precipitable). No es inusual que las moléculas de unión a una categoría, los restos de señalización enzimáticos y el sustrato se apliquen a la reacción en momentos distintos.

Por complejo de restos de señalización se quiere decir una célula física que comprende más de un resto de señalización y más de una molécula de unión a una categoría. La asociación física de los restos de señalización y las moléculas de unión a una categoría en un complejo de restos de señalización debe ser estable (por ejemplo, los restos de señalización y las moléculas de unión a una categoría deben tener semividas medias de asociación con el complejo de al menos un día en PBS a 4°C). Como ejemplo de un complejo de restos de señalización, se considera una micropartícula de poliestireno que está recubierta por miles de moléculas de dos tipos: un anticuerpo específico de célula diana y fosfatasa alcalina. Un complejo de restos de señalización de este tipo se une a la célula diana mediante la molécula de unión a una categoría de anticuerpo conjugado. Cuando se incuba con un sustrato de fosfatasa alcalina cromogénico (el elemento de señal; por ejemplo, BM púrpura, Roche), puede generarse un punto coloreado que puede detectarse a simple vista. Alternativamente, el mismo complejo de restos de señalización, cuando se incuba con un sustrato de fosfatasa alcalina o bien quimioluminiscente o bien fluorescente, genera una señal o bien quimioluminiscente o bien fluorescente. Ejemplos adicionales de complejos de restos de señalización incluyen: partículas de nano-oro conjugadas con anticuerpos marcados con fluoresceína, y partículas de látex conjugadas tanto con moléculas de unión a una categoría de oligonucleótidos como con ésteres de acridinio que emiten quimioluminiscencia tras la adición de peróxido de hidrógeno.

Por carácter de la señal de un elemento de señal o resto de señal se quiere decir el aspecto o aspectos de una señal generada por el resto de señalización del elemento de señal que es útil para distinguirlo de otros elementos de señal o restos de señalización. Por ejemplo, el carácter de la señal de un resto de señalización marcado con fluoresceína y rodamina es la *fluorescencia*. El carácter de un transpondedor de radio es la radiofrecuencia. Ejemplos del carácter de la señalización fotónica son la fluorescencia, dispersión de luz, fosforescencia, reflectancia, absorbancia, quimioluminiscencia y bioluminiscencia. Todos menos los dos últimos ejemplos del carácter de la señalización fotónica dependen de la iluminación externa (por ejemplo, una fuente de luz blanca, una fuente de luz láser o luz diurna). En cambio, la quimioluminiscencia y la bioluminiscencia son caracteres de la señalización que son independientes de las fuentes de luz externas.

Por la clase de un elemento de señal o resto de señalización se quiere decir la cualidad diferente de la señal que es útil para distinguirla de otros elementos de señal o restos de señalización. Por ejemplo, un liposoma que está marcado con colorante rojo se distingue de liposomas coloreados de manera diferente. El color rojo es su clase. Para un microtransmisor que transmite una señal de radiofrecuencia particular, la cualidad de la señal de radiofrecuencia que diferencia el microtransmisor de otros microtransmisores constituye la clase del elemento de señal.

Por firma de señal se quiere decir la cualidad de señalización distintiva de la combinación de restos de señalización que se unen a una categoría de células diana en una prueba. Una célula diana que se une a cuatro tipos de anticuerpos, uno de los cuales está conjugado a una molécula de fluoresceína y tres de los cuales están conjugados con moléculas de rodamina, tiene una firma de señal que se describe mediante los espectros de emisión y absorbancia ponderados combinados de la fluoresceína y la rodamina.

Por complejidad de señal de una prueba o un conjunto de moléculas de unión a una categoría marcadas se quiere decir el número de categorías de células diana que pueden marcarse claramente en la prueba o mediante la unión al conjunto. Alternativamente, la complejidad de señal se define como el número de firmas de señal distintas que se esperaría que se produjesen si estuviese presente un miembro de cada categoría de célula diana. Para algunas pruebas, la complejidad de señal de un conjunto de moléculas de unión a una categoría es la misma que el número de categorías que explora la prueba. Otras pruebas, que exploran muchas categorías, pueden tener sólo una complejidad de señal de uno.

Por fuerza de selección se quiere decir una fuerza que se usa para capturar, aislar, mover o secuestrar células diana. Los ejemplos de fuerzas de selección incluyen la gravedad, el magnetismo, el potencial eléctrico, la fuerza centrífuga, la fuerza centrípeta, la densidad de flotación y la presión. Las células diana pueden movilizarse mediante una fuerza de selección que actúa sobre la célula diana sola. Alternativamente, las fuerzas de selección pueden actuar específicamente sobre células diana que están asociadas con restos de selección (véase la definición a continuación).

Los ejemplos de la aplicación de fuerzas de selección para movilizar células diana incluyen: centrifugación de células diana; selección magnética de células diana unidas a partículas magnéticas; sedimentación gravitacional de células diana marcadas con partículas metálicas; y deposición de células diana sobre una membrana porosa mediante filtración a vacío.

Por resto de selección se quiere decir un átomo, molécula, partícula o célula que pueden conjugarse con una

- molécula de unión a una categoría y que confiere a la molécula de unión a una categoría la capacidad de capturar, aislarse, moverse o secuestrarse selectivamente mediante una fuerza de selección. Cuando un complejo de molécula de unión a una categoría:resto selectivo se une específicamente a una célula diana, generalmente la célula diana también puede capturar, aislarse, moverse o secuestrarse selectivamente mediante la fuerza de selección. Selectivo se refiere a la concesión preferente de sensibilidad a la movilización mediante la fuerza de selección sobre restos de selección y células asociadas con respecto a células no asociadas con restos de selección.
- Partículas paramagnéticas y ferritina son ejemplos de restos de selección. Una partícula de sílice densa que se hunde en disolución es otro tipo de resto de selección. Tales partículas, cuando se recubren con moléculas de unión a una categoría y se unen a una célula diana microbiana, producirán que la célula diana se hunda en disolución acuosa, permitiendo así la separación de la célula diana unida de otros constituyentes no unidos de la muestra.
- Por carácter selectivo se quiere decir el aspecto o aspectos de un resto de selección que es útil para capturar, seleccionar o mover el resto de selección. Por ejemplo, el carácter selectivo de una partícula paramagnética es el *magnetismo*. El carácter selectivo de una partícula de sílice que se hunde rápidamente en disolución acuosa es la *masa*.
- Por un sustrato o una superficie aproximadamente plana se quiere decir una superficie que puede alinearse en paralelo con un plano imaginario de manera que cuando la distancia se mide desde puntos en cualquier cuadrado de 1 mm x 1 mm en la superficie hasta los puntos más cercanos en el plano imaginario, el valor absoluto de la distancia media es inferior a 50 micras.
- Por superficie de detección se quiere decir la superficie de un sustrato aproximadamente plano sobre el que se depositan células diana. En realizaciones que usan un carácter de señalización fotónico, si la superficie de detección es ópticamente transparente, la detección puede efectuarse a través de cualquier cara de la superficie de detección. Si la superficie de detección es opaca, la detección se efectúa a través de la cara de la superficie de detección sobre la que se depositan las células diana.
- Por área de detección se quiere decir el área de la superficie de detección que se muestrea simultáneamente mediante un dispositivo de detección. Por ejemplo, la sección de un portaobjetos de vidrio del que se obtienen imágenes simultáneamente mediante un dispositivo óptico que incluye una lente de recogida y un chip de CCD podría medir 0,8 cm x 0,5 cm. El área de detección es entonces de 0,4 cm².
- Por zona de detección se quiere decir el volumen en el que pueden detectarse células diana en replicación mediante el dispositivo de detección. La zona de detección tiene las mismas dimensiones que el área de detección pero tiene una profundidad correspondiente a la profundidad en la que la señal de las células diana en replicación puede detectarse e identificarse. La profundidad de la zona de detección es dependiente por tanto de los criterios umbral usados para puntuar una señal positiva. Cuando se usa detección óptica, la profundidad de la zona de detección depende de la profundidad óptica del campo.
- Por la dimensión más larga de un área de detección se quiere decir la línea de longitud máxima que puede trazarse entre dos puntos en el perímetro del área de detección. Por ejemplo, si el área de detección es un rectángulo que mide 0,3 cm x 0,4 cm, la dimensión más larga del área de detección es la diagonal, 0,5 cm. Si el área de detección es una elipse con un semieje mayor de una longitud de 7 mm y un semieje menor de una longitud de 2,5 mm, la dimensión más larga del área de detección es de 14 mm.
- Por detección de grandes áreas u obtención de imágenes de grandes áreas se quiere decir un método para detectar células diana microscópicas en el que el área de detección (el área que se analiza simultáneamente mediante el dispositivo de detección) es mucho más grande que las dimensiones de las células diana o microcolonias. El área de detección para la detección de grandes áreas tiene al menos una dimensión lineal que es ≥ 1 mm. En cambio, las colonias microscópicas son sustancialmente más pequeñas, midiendo normalmente menos de 50 μm en al menos dos dimensiones ortogonales. Ejemplos de detección de grandes áreas incluyen la obtención de imágenes de un área de detección de 9 mm de diámetro con una cámara de CCD; la obtención de imágenes de un rectángulo de 2 cm x 1 cm explorando con un detector de matriz lineal que tiene una dimensión larga de 1 cm; y la obtención de imágenes de un filtro de 4 cm x 4 cm usando exposición directa sobre película fotográfica.
- Algunas tecnologías exploran muestras para detectar microcolonias pero no se aprovechan de la detección de grandes áreas. Los ejemplos incluyen citometría de barrido por microhaz de láser en fase sólida y examen microscópico de múltiples campos microscópicos de alta potencia sobre un portaobjetos.
- Por asociado de manera estable o conjugado se quiere decir una asociación física entre dos entidades en las que la semivida media de asociación es al menos de un día en PBS a 4°C. Considérese, por ejemplo, el caso complejo de la adsorción pasiva de proteínas a partículas de poliestireno. Hay varias clases diferentes de proteínas adsorbidas. Algunas proteínas están asociadas de manera estable a la superficie con semividas de muchos meses. Otras proteínas, tales como aquellas que están unidas de manera suelta en la capa externa de proteína adsorbida, pueden no estar asociadas de manera estable con las partículas y pueden lixiviarse en el plazo de horas.

- 5 Por partícula se quiere decir una matriz rígida (es decir, con al menos algunas características de un sólido), que mide menos de un milímetro a lo largo de cualquier eje. Las partículas pueden doparse o conjugarse con elementos de señal. Las partículas se denominan a menudo partículas o con términos que reflejan sus dimensiones o geometrías. Por ejemplo, los términos nanoesfera, nanopartícula o nanoperla se usan para referirse a partículas que miden menos de 1 micra a lo largo de cualquier eje dado. De manera similar, los términos microesfera, micropartícula o microperla se usan para referirse a partículas que miden menos de un milímetro a lo largo de cualquier eje dado. Los ejemplos de partículas incluyen partículas de látex, partículas de poliacrilamida, micropartículas de magnetita, ferrofluidos (nanopartículas magnéticas), puntos cuánticos, etc.
- 10 Por intensificador de imagen o tubo de imagen se quiere decir un dispositivo que amplifica una señal fotónica, tal como se define en el glosario de Inoué, Shinya, *et al.*, *Video microscopy: the fundamentals* (Plenum Press, Nueva York, 1997; pág. 665): “Un dispositivo acoplado (mediante fibras ópticas o lentes) a un tubo de cámara de vídeo para aumentar la sensibilidad. El intensificador es un tubo de vacío con un fotocátodo en el extremo frontal que emite electrones según la imagen enfocada tras él, una lente de electrones y/o placa(s) de microcanales que enfocan los electrones sobre un fósforo en el extremo trasero, y un acelerador de alto voltaje que aumenta la energía de los electrones. Puede ser de una única o múltiples fases”. Se describe una variedad de tales intensificadores de imágenes en detalle en el Capítulo 8 de la misma referencia.
- 15 Por detección simultánea en una sección del área de detección se quiere decir la detección de la señal a partir de una sección de una superficie de detección aproximadamente plana en una etapa. La obtención de imágenes de grandes áreas de dianas en un área de detección usando un chip de CCD, detección visual o integración de señales a base de fotodiodos son ejemplos de detección simultánea.
- 20 Por identificación se quiere decir determinar la categoría o categorías de las que una célula diana es un miembro.
- Por muestra se quiere decir material que se explora mediante la invención para detectar la presencia de células diana.
- 25 Por detección visual directa se quiere decir detección visual sin la ayuda de instrumentación aparte de lentes correctoras que pueden llevarse puestas.
- Por detector fotoeléctrico se quiere decir un dispositivo o instrumento artificial que transduce señales fotónicas a señales eléctricas. Ejemplos de detectores fotoeléctricos incluyen detectores de CCD, detectores de tubos fotomultiplicadores y detectores de fotodiodos, por ejemplo, fotodiodos de avalancha.
- 30 Por energía circunscrita o energía encuadrada se quiere decir el porcentaje de fotones de una fuente de luz infinitamente pequeña que son capturados en un píxel de una matriz fotodetectora.
- Por radiación térmica se quiere decir la radiación del cuerpo negro.
- 35 Por autofluorescencia celular o autofluorescencia se quiere decir la fluorescencia mostrada por células debido a la fluorescencia de constituyentes celulares intrínsecos naturales, tales como NADH y flavoproteínas oxidadas. Las células que expresan fluorescencia debido a proteínas fluorescentes recombinantes tales como la proteína fluorescente verde no se considera que son autofluorescentes.
- 40 Por replicación *in situ* se quiere decir la replicación de una célula diana en su sitio, de modo que las células hijas permanecen esencialmente colocalizadas con la célula diana progenitora. Por ejemplo, en el cultivo biológico *in vitro* de bacterias sobre placas de agar nutritivo, se depositan bacterias dispersadas individuales sobre una placa y se incuban en condiciones que permiten la replicación bacteriana. Una bacteria en una determinada ubicación se replica dando lugar a células de progenie que también se replican. Todas las células permanecen colocalizadas (esencialmente contiguas) con la célula original, dando lugar finalmente a una colonia visible sobre la placa. Donde hubo anteriormente una única célula, hay ahora una colonia de más de 10^7 células.
- 45 Por una microcolonia de células diana se quiere decir un grupo de células diana que se encuentran en proximidad física estrecha entre sí, que se encuentran sobre (o ancladas a) una superficie y que son los descendientes clonales mediante amplificación basada en replicación *in vitro* e *in situ* de una única célula diana ancestral. Una microcolonia generalmente es demasiado pequeña para ser visible a simple vista (por ejemplo, menos de 50 micras de diámetro).
- 50 Cualquier tipo de célula diana en división puede dar lugar a microcolonias en situaciones que conducen a una colocalización física de los descendientes clonales de las células diana. Por ejemplo, las microcolonias podrían contener células animales o vegetales, hongos o bacterias.
- Por iluminación se quiere decir irradiar con radiación electromagnética. Puede usarse para iluminar radiación electromagnética de diversas longitudes de onda. Incluye, por ejemplo, radiación con longitudes de onda en las regiones de rayos X, UV, visible e infrarroja del espectro. Obsérvese que la radiación de iluminación no está necesariamente en el intervalo visible.
- Por elementos de señal o restos de señalización con carácter de señalización fotónico se quiere decir elementos de

- señal o restos de señalización que pueden detectarse a través de la emisión, reflexión, dispersión, refracción, absorción, captura o redirección de fotones, o cualquier otra modulación o combinación del comportamiento de fotones. Algunos ejemplos de elementos de señal o restos de señalización que tienen carácter de señalización fotónico incluyen: el fluoróforo Rojo Texas (carácter de señalización fluorescente); CDP-Star (carácter de señalización quimioluminiscente); luciferasa (carácter de señalización bioluminiscente); partículas de dispersión resonante de luz (carácter de señalización de dispersión de luz); BM púrpura (carácter de señalización cromogénico o de absorción de luz); y fósforos de conversión ascendente (absorción de dos fotones de longitud de onda larga y emisión de un fotón de longitud de onda más corta).
- 5
- Por "número" X "nombre de la disolución" se quiere decir una disolución acuosa que comprende los constituyentes del nombre de la disolución a un número de veces la concentración de la disolución (excepto para el agua). Por ejemplo, 10X EE contiene EDTA 10 mM/EPPS 100 mM (EE, o 1X EE, contiene EDTA 1 mM/EPPS 10 mM).
- 10
- EE es una disolución que es EDTA 1 mM/EPPS 10 mM. Antes de mezclarlos entre sí, los ácidos conjugados de ambos componentes se llevan hasta pH 8,0 con NaOH
- PB es tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4.
- 15
- PBS es una solución salina tamponada con fosfato que contiene: NaCl 120 mM, KCl 2,7 mM y tampón fosfato 10 mM (sal de sodio) pH 7,4.
- PBS-B es BSA al 0,1% (sin IgG; número de catálogo de Sigma A-7638) en PBS.
- PBS-T es Triton X-100 al 0,05% (número de catálogo de Sigma X-100) en PBS
- PBS-TB es PBS/BSA al 0,1%/Triton X-100 al 0,05%
- 20
- PBT es PBS/BSA al 0,1% (sin IgG; número de catálogo de Sigma A-7638)/Tween-20 al ,05% (número de catálogo de Sigma X-100)
- LB es caldo Luria para el crecimiento de bacterias y se prepara tal como se describió anteriormente (Ausubel 1987, *supra*).
- SSC es NaCl 150 mM/citrato de Na₃ 15 mM ajustado a pH 7,0 con HCl.
- 25
- EDAC es (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
- TSA es agar de tripticasa soja (Becton Dickinson/Difco; número de catálogo 236950).
- TSB es caldo de tripticasa soja Bacto™ (número de catálogo de Becton Dickinson 211822).
- AP es fosfatasa alcalina.
- BSA es albúmina sérica bovina.
- 30
- CCD es un dispositivo de carga acoplada.
- Ufc es la unidad formadora de colonias (una medición de la concentración bacteriana que corresponde al número de células bacterianas viables).
- FITC es isotiocianato de fluoresceína.
- ANP es ácido nucleico peptídico.
- 35
- A menos que se indique lo contrario, las cepas microbiológicas descritas en la memoria descriptiva se obtienen de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1. El cultivo microbiano tradicional requiere muchas generaciones de división celular.
- El largo de tiempo hasta conseguir resultados del cultivo microbiano tradicional resulta del tiempo requerido para generar suficientes células diana microscópicas para que sean visibles a simple vista.
- 40
- Figura 2. El concepto de detección rápida del crecimiento microbiano detectando microcolonias
- La invención logra una rápida enumeración de células en crecimiento obteniendo imágenes de microcolonias que contienen menos células de las que contienen las macrocolonias que se detectan a simple vista usando el método tradicional. La invención es más rápida porque se requieren menos generaciones que para el método tradicional.
- 45
- Figura 3. Un dispositivo de obtención de imágenes CCD para la obtención de imágenes de grandes áreas

El dispositivo de obtención de imágenes basado en CCD representado en la figura se usó para recoger muchos de los datos descritos en los ejemplos (véase también la etapa 5 de la sección de Descripción detallada). En un ejemplo, se proporciona luz de excitación introduciendo luz de una fuente de luz blanca de alta intensidad (lámpara de arco de xenón de 1000 vatios, modelo A-6000, Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ) en una guía de luz líquida (diámetro de núcleo de 5 mm, modelo 380, Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ). La guía de luz líquida porta la luz hasta una rueda de filtros de excitación (BioPoint FW, Ludl Electronics, Hawthorne, NY) y dirige el rayo filtrado (normalmente de 9 mm de diámetro) sobre la superficie de detección que contiene las células diana marcadas. La superficie de detección es el fondo ópticamente transparente de un pocillo de una placa de microtitulación. Sin embargo, el mismo aparato puede detectar células diana marcadas en varias superficies de detección (por ejemplo, portaobjetos de microscopio, cubreobjetos y tubos con fondos planos, ópticamente transparentes). La luz incidente choca contra la superficie de detección induciendo fluorescencia en los restos de señalización que están unidos a células diana a través de moléculas de unión a una categoría y que están depositadas en la superficie ópticamente transparente. Una parte de la luz fluorescente emitida se recoge mediante un sistema de lentes de alta eficiencia de recogida y se transmite a través de una rueda de filtros de emisión (BioPoint FW, Ludl Electronics) hasta una cámara de CCD (Orca II, Hamamatsu, Bridgewater, NJ).

Figura 4. Un sistema de obtención de imágenes de CCD para la obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

La figura muestra un dispositivo de obtención de imágenes de CCD con una configuración de iluminación angular en el que se introduce luz sobre la superficie de detección (mostrada en este caso como el fondo de un pocillo de una placa de microtitulación) en un ángulo desde el lado de la óptica de recogida. El ángulo se elige para optimizar la eficiencia de recogida y para evitar la obstrucción del rayo incidente por la lente de recogida. La ventaja de esta configuración es que las reflexiones de la superficie del fondo del soporte de la muestra no se recogen por la lente de recogida y por tanto no contribuyen al ruido de fondo de la fluorescencia.

Figura 5. Detección sin reactivos de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

La figura representa un método rápido para enumerar el crecimiento bacteriano sin usar un reactivo de marcaje. La autofluorescencia intrínseca de las células diana en microcolonias se detecta usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas basada en CCD. Las ventajas de este enfoque sin reactivos incluye su simplicidad, que no es destructivo y su amplia aplicabilidad. Alternativamente, pueden usarse reactivos de marcaje que se unen a sitios de unión específicos de célula diana (por ejemplo, anticuerpos fluorescentes o sondas de ácido nucleico) para detectar microcolonias que contienen células diana.

Figura 6. Detección e identificación de microcolonias bacterianas usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (Ejemplo 1)

La figura muestra un método rápido, sencillo y sensible para detectar microcolonias mediante obtención de imágenes de microcolonias marcadas usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas basada en CCD. En este ejemplo, se dejó que células individuales experimentaran varias generaciones de replicación con el fin de formar microcolonias. Las microcolonias se marcaron o bien con Syber Green I o bien con un anticuerpo marcado con FITC. En la Figura 7, la fila superior de los paneles muestra el punto de tiempo de hora 0 que contiene células individuales. La fila inferior de paneles muestra las microcolonias tras 3 horas de incubación. Hay un aumento sustancial en el tamaño y la señal de los objetos detectados mediante la obtención de imágenes de CCD a lo largo del tiempo debido al aumento en el número de células en los sitios en los que se depositaron originalmente las células formadoras de colonias.

Figura 7. Detección basada en autofluorescencia de microcolonias bacterianas usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (Ejemplo 2)

La figura representa un método rápido, sencillo y sensible para detectar microcolonias mediante obtención de imágenes de señales autofluorescentes celulares usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas basada en CCD. Se depositaron células dispersadas individuales sobre un filtro, que se incubó en medio de crecimiento durante 5,25 horas a 37°C. Las microcolonias (que resultaban del crecimiento clonal de las células dispersadas individuales) generaron una señal autofluorescente sustancial (panel izquierdo) en comparación con un filtro sobre el que no se depositaron bacterias (panel derecho) sino que se preparó de otra manera y se obtuvieron imágenes de manera idéntica.

Figura 8. Un método sencillo para validar una prueba de enumeración microbiana rápida sin reactivos usando una comparación interna con el método de cultivo tradicional (Ejemplo 3)

La figura muestra un método sencillo para demostrar la equivalencia de la enumeración de microcolonias con el método tradicional. El uso de detección no destructiva de autofluorescencia de microcolonias permite que las microcolonias detectadas mediante la invención vuelvan a incubarse hasta que maduren para dar las macrocolonias que se detectan usando el recuento de colonias visibles tradicional. Obsérvese que el patrón de puntos formado por las microcolonias (panel izquierdo) corresponde al patrón formado por las colonias visibles (panel derecho), indicando la equivalencia de los dos métodos.

Figura 9. Exactitud y límite de detección de la detección de microcolonias autofluorescentes usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (Ejemplo 4)

5 La figura muestra el método usado para medir la exactitud de la invención cuando las muestras contienen niveles extremadamente bajos de células diana. Para cada uno de los 101 filtros, el resultado obtenido puntuando las microcolonias autofluorescentes fue igual que el resultado obtenido mediante el método tradicional.

Figura 10. Determinación del número de células microbianas en microcolonias bacterianas autofluorescentes detectadas rápidamente usando obtención de imágenes no aumentadas sin reactivos (Ejemplo 5)

10 La figura muestra la señal generada a partir de microcolonias de *E. coli* usando obtención de imágenes de grandes áreas de microcolonias de *Escherichia coli* (panel superior). Las tres microcolonias de las que se obtuvieron imágenes con microscopía de alta potencia en los paneles inferiores corresponden a las tres microcolonias de las que se obtuvieron imágenes usando la invención en el panel superior. El número de bacterias en cada microcolonia se indica debajo de cada imagen (45, 48 y 50 células). La figura demuestra que las microcolonias que contienen bajos números de células *E. coli* pueden detectarse usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas sin reactivos.

15 Figura 11. Detección e identificación mediante obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas, basada en CCD de microcolonias bacterianas en una muestra de agua medioambiental (Ejemplo 6)

20 La figura muestra el análisis del crecimiento bacteriano usando la invención para detectar colonias bacterianas en agua del río Charles. Se recogieron células bacterianas sobre filtros de éster mixto de celulosa. Se colocaron los filtros sobre una placa de agar R2A, y se incubaron durante 74 horas a 32,5°C. A diversos puntos de tiempo, se obtuvieron imágenes de los filtros usando reflectancia de luz blanca y autofluorescencia. Se identificaron macrocolonias que tenían 0,55 mm o más de diámetro y se contaron en las imágenes de reflectancia. Se determinaron también los puntos de tiempo a los cuales podían detectarse las microcolonias autofluorescentes que dieron lugar a macrocolonias. A diversos puntos de tiempo, se representó gráficamente el porcentaje de las macrocolonias a las 74 h que podían detectarse como microcolonias autofluorescentes.

25 Figura 12. Correlación entre detección mediante obtención de imágenes de grandes áreas, no aumentadas, basada en CCD de microcolonias bacterianas y un método clásico de cultivo de vertido en placa para enumerar bacterias en una muestra (Ejemplo 7)

La figura compara la enumeración de microcolonias autofluorescentes obtenidas usando la invención y el método tradicional de vertido en placa de cultivo microbiano.

30 Figura 13. Linealidad e intervalo dinámico de una prueba de enumeración sin reactivos (Ejemplo 8)

La figura muestra el análisis de intervalo dinámico y linealidad usando la invención para detectar microcolonias autofluorescentes.

Figura 14. Pruebas de eficacia del conservante antimicrobiano sin diluciones de la muestra (Ejemplo 9)

35 La figura muestra que se obtienen resultados de eficacia del conservante antimicrobiano comparables usando métodos tradicionales y de la invención. La comparación muestra el potencial de la invención para eliminar la mayoría del trabajo y el gasto de esta prueba obviando la necesidad de analizar cientos de diluciones de la muestra.

Figura 15. Detección basada en autofluorescencia de un biológico con estrés térmico usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (Ejemplo 10)

40 La figura muestra la correlación entre la enumeración de células indicadoras biológicas con estrés térmico usando la invención y el método de vertido en placa tradicional. Se sometió el indicador biológico *G. stearothermophilus* a una variedad de regímenes de estrés térmico. Se midió la autofluorescencia de las microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas basada en CCD y se contaron visualmente las macrocolonias visibles. Los resultados de los dos métodos se representan gráficamente unos frente a otros y muestran buena correlación. Sin embargo, la invención requería sustancialmente menos diluciones que el método tradicional.

45 Figura 16. Detección basada en autofluorescencia de microcolonias bacterianas en carne picada (Ejemplo 11)

50 La figura muestra los tiempos de detección de microcolonias autofluorescentes y macrocolonias que provienen de microbios en carne picada. El seguimiento del aspecto a lo largo del tiempo de microcolonias que dieron lugar a las macrocolonias a las 48 h mostró que el 100% de las macrocolonias se detectaron mediante la invención a las 16 h. Esto muestra el potencial de la invención para reducir el tiempo requerido para lograr resultados de manera significativa en comparación con los métodos tradicionales.

Figura 17. Selección magnética seguida por detección de microcolonias (¡Error! No se encuentra la fuente de referencia y ejemplo 12)

Se muestra un esquema para la selección magnética de células diana seguida por crecimiento *in situ* y detección de autofluorescencia de las microcolonias usando la invención.

Figura 18. Detección de bacterias en una muestra compleja con selección magnética no específica seguida por detección de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (Ejemplo 12)

- 5 La figura muestra los resultados de un experimento en el que se capturaron magnéticamente bacterias *S. aureus* a partir de sangre completa. Las bacterias se seleccionaron a partir de una muestra de sangre usando partículas magnéticas recubiertas con una mezcla de agentes ampliamente reactivos que se unen a bacterias. Tras la filtración, la siembra en placa y la incubación (6 h), se detectaron las microcolonias autofluorescentes usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas. Se dejaron incubar los filtros durante la noche. Después
- 10 de eso, se obtuvieron de nuevo imágenes de los filtros (imágenes no mostradas) y se verificó la posición de microcolonias de seis horas que han crecido para dar macrocolonias, eliminando la posibilidad de que se hubiesen confundido microcolonias con polvo u otros materiales particulados.

Figura 19. Esquema para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas (Ejemplo 13)

- 15 La figura representa un método rápido para someter a prueba la sensibilidad de una cepa bacteriana a un antibiótico detectando el aspecto de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas basada en CCD. Para la cepa de bacterias mostrada, no pueden formarse microcolonias cuando las bacterias se hacen crecer en presencia del antibiótico (columna derecha) indicando sensibilidad al antibiótico. Las bacterias tampoco crecen sin incubación en condiciones de crecimiento (columna izquierda). Tal como se esperaba, se detecta crecimiento cuando la cepa se incuba en condiciones de crecimiento en ausencia del antibiótico (columna central).

20 Figura 20. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas (Ejemplo 13)

- La figura muestra los resultados de una prueba de sensibilidad antimicrobiana que compara el crecimiento de cepas bacterianas (una sensible a y una resistente al antibiótico tetraciclina) como microcolonias sobre placas de agar que contienen el antibiótico. Se filtraron células bacterianas de cada cepa sobre una membrana de policarbonato, se colocaron sobre placas de agar LB que contenían tetraciclina y luego se incubaron durante tres horas a 37°C
- 25 (columnas marcadas "hora 3"). Se colocaron otros filtros preparados de manera similar sobre placas de agar LB que contenían tetraciclina durante menos de 5 minutos a temperatura ambiente (columnas del panel marcado "hora 0"). Se fijaron los filtros y se tiñeron con una tinción de ácido nucleico. La obtención de imágenes de CCD de las membranas que contenían bacterias que se incubaron durante tres horas (columna marcada: "CCD hora 3") detectó el crecimiento de microcolonias sobre las membranas que contenían la cepa resistente pero no la cepa sensible. Se confirmó el crecimiento de microcolonias sobre los filtros que contenían la cepa resistente pero no la sensible mediante microscopía de fluorescencia de alta potencia (columna marcada: "microscopio hora 3"). Tal como se esperaba, no se detectaron microcolonias en la imagen de CCD de los filtros que no se incubaron en condiciones de crecimiento (columna marcada: "CCD hora 0") y sólo se detectaron células dispersadas individuales mediante
- 30 microscopía de fluorescencia de alta potencia. Se usó el análisis de imágenes por ordenador para cuantificar los resultados de la obtención de imágenes de CCD de las membranas (gráfico de barras). La membrana que contenía microcolonias formadas por la cepa resistente generó aproximadamente 25 veces más intensidad de lo que lo hizo la membrana que contenía la cepa sensible. Los resultados de este experimento muestran que la detección de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas es un método rápido y sensible para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

40 Figura 21. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas usando el método de difusión de disco y obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (Ejemplo 14)

- La figura muestra los resultados de una prueba de difusión de disco para la sensibilidad antimicrobiana que compara el crecimiento de cepas bacterianas (una sensible y una resistente). Pudieron detectarse microcolonias autofluorescentes, que crecían sobre o cerca del disco de difusión, tras 5 horas de crecimiento, reduciendo en gran medida el tiempo hasta la detección de un crecimiento durante la noche convencional. El panel izquierdo muestra la cepa resistente a Tet que crece cerca del disco de difusión, mientras que el panel de la derecha muestra la falta de crecimiento de la cepa sensible a Tet. Se dejaron incubar las placas de difusión de disco durante la noche. Se compararon las zonas de inhibición a las 24 horas con las zonas a las 5 horas. La zona de inhibición a las 24 horas era igual que el resultado de microcolonias a las 5 horas, indicando que la invención puede proporcionar resultados más rápidos pero comparables en comparación con el método tradicional.
- 50

Figura 22. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas usando el E-test™ y obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (Ejemplo 15)

- La figura muestra los resultados de una prueba de sensibilidad antimicrobiana que compara el crecimiento de cepas bacterianas (una sensible y una resistente) usando tiras Etest™ que contienen el antibiótico tetraciclina. Se extendieron células bacterianas sobre placas de TSA. Se añadió directamente una tira E-test™ a las placas, que se incubaron a 37°C. Pudieron detectarse microcolonias autofluorescentes que crecían sobre o cerca de la tira E-test™ tras 5 horas de crecimiento. El panel izquierdo muestra la cepa resistente a las 5 horas creciendo cerca del
- 55

segmento de 256 µg/ml de la tira. El panel de la derecha muestra la cepa sensible a las 5 horas con una zona de inhibición cerca del segmento de 2 µg/ml de la tira. Las placas E-Test™ se dejaron incubar durante la noche. Las zonas de inhibición a las 24 horas eran comparables a las zonas a las 5 horas, indicando que los resultados más rápidos obtenidos con la invención son comparables al método tradicional más lento.

5 Descripción detallada de la invención

Visión general de la invención

La invención analiza de manera rápida y económica una muestra mínimamente procesada para detectar células en crecimiento. Tanto el método de la invención como el de cultivo bacteriano tradicional miden el crecimiento celular detectando la formación de "colonias" bacterianas (agrupaciones de células asociadas que surgen a partir de células individuales mediante divisiones celulares sucesivas (Figura 1). Sin embargo, la invención detecta el crecimiento celular más rápidamente que el cultivo microbiano tradicional, porque detecta microcolonias que aparecen en una fase más temprana que las macrocolonias observadas visualmente mediante el cultivo microbiano tradicional (Figura 2, Figura 8). Usando los mismos principios del método que el cultivo microbiano, la invención puede conservar las ventajas del método tradicional mientras que mejora todavía el tiempo hasta conseguir resultados de manera significativa.

Para entender cómo la invención detecta microcolonias es útil examinar una aplicación y realización específicas. Por ejemplo, considérese una prueba para enumerar los microbios en el agua usada para fabricar un producto farmacéutico inyectable. Los microbios en una muestra del agua (100 ml) se concentran e inmovilizan haciendo pasar el líquido a través de una membrana porosa. La membrana que contiene los microbios se coloca en medio de crecimiento nutritivo en una placa de Petri desechable. Los microbios se incuban a 32°C para dejar que se repliquen y formen microcolonias. Se dirige luz a la superficie de la membrana haciendo que las células en las microcolonias emitan autofluorescencia. Esta señal de autofluorescencia proviene de biomoléculas que están presentes en las células (por ejemplo, NADH y flavoproteínas oxidadas). Se obtienen entonces imágenes de microcolonias autofluorescentes de manera electrónica. La luz que se origina a partir de una microcolonia individual choca contra un píxel o pequeño agrupamiento de píxeles adyacentes sobre un fotodetector de matriz de CCD. El número de microcolonias autofluorescentes se calcula inmediatamente mediante software de procesamiento de imágenes y se notifica al usuario. Obsérvese que el proceso es idéntico al cultivo microbiano tradicional, excepto que la invención detecta los resultados más rápido y de manera automática.

Debido a que esta realización de la invención no es destructiva (es decir, no destruye ni daña los microbios), las microcolonias detectadas pueden hacerse crecer para dar cultivos puros. Estos cultivos puros pueden usarse para la identificación microbiana y, para muestras clínicas, para determinar la sensibilidad y la resistencia antimicrobianas. La detección no destructiva también simplifica la validación de la equivalencia del método con la enumeración microbiana tradicional. Tras detectar las microcolonias usando la invención, la placa de Petri puede volver a incubarse de manera sencilla para dejar que las microcolonias crezcan durante el periodo de tiempo requerido para generar las macrocolonias visibles detectadas mediante la detección con cultivo microbiano tradicional. La comparación del número y la ubicación de las microcolonias detectadas mediante la invención con las colonias visibles que provienen del crecimiento adicional de las microcolonias facilita la determinación de la equivalencia del método de la invención y el tradicional.

La invención puede usarse para construir pruebas usando varios formatos, métodos de marcaje, moléculas de unión a una categoría y métodos de detección. Sin embargo, las pruebas tienen varias características clave en común. Las etapas y procedimientos que son comunes a muchas realizaciones de la invención se describen a continuación.

La configuración general de las aplicaciones de la invención o divulgación, respectivamente, incluye las siguientes etapas:

Etapas 1: Formulación de la cuestión de prueba, elección de la muestra, categorías de células que van a detectarse, las condiciones de crecimiento y carácter de señalización

Etapas 2: Deposición de las dianas celulares en el área de detección

Etapas 3: Dejar que se produzca la replicación celular para formar microcolonias

Etapas 4: Marcaje opcional de las microcolonias

Etapas 5: Enumeración de las microcolonias

La formulación de la cuestión que va a responderse mediante la prueba es la primera etapa en la creación de una nueva aplicación basada en la invención. Algunos ejemplos de cuestiones importantes que los microbiólogos industriales y clínicos deben abordar se enumeran en la tabla 3. La expresión de la cuestión de prueba define generalmente el tipo de muestra que debe someterse a prueba (por ejemplo, carne picada, muestra de orina clínica o un producto farmacéutico terminado). El tipo y volumen de muestra son parámetros importantes en la elección de

los métodos para depositar las células diana en el área de detección (véase la etapa 2). La expresión de la cuestión de prueba también define los tipos, o categorías, de células que deben detectarse en la aplicación (por ejemplo, bacterias aerobias, levaduras o mohos, *pseudomonas*, *E. coli* O157:H7 o un aislado de líquido cefalorraquídeo anónimo).

Ejemplos de cuestiones respondidas mediante pruebas basadas en la invención

- ¿Indica el número de bacterias en una muestra de orina una infección del tracto urinario?
- ¿Contiene una muestra de sangre de un paciente microbios infecciosos viables?
- ¿Qué antibiótico es el mejor para tratar a un paciente particular con meningitis bacteriana?
- ¿Cuántas bacterias aerobias están presentes en 25 g de carne?
- ¿Hay células del patógeno transmitido por los alimentos *E. coli* O17:H7 en una muestra de carne picada?
- ¿Cuántas células de mohos y levaduras están presentes en una muestra de aire medioambiental?
- ¿Cuántas células de *Pseudomonas* están presentes en 10 g de un comprimido farmacéutico sin receta médica?
- ¿Es estéril el lote de producto terminado de un fármaco inyectable?
- ¿Cuántas células de levaduras están presentes en una muestra de producción de cerveza?

Tabla 3

5

Tras definir el tipo de células que van a detectarse o enumerarse, se eligen las condiciones para promover el crecimiento de las células en el área de detección. Los parámetros importantes para permitir la replicación celular incluyen: la composición del medio de crecimiento, la presencia de reactivos selectivos tales como antibióticos, la temperatura y el nivel de oxígeno y otros gases. Si es posible, se eligen condiciones de crecimiento que promueven el crecimiento de las células que van a detectarse pero que son resistentes al crecimiento de otros tipos de células. Por ejemplo, los medios para detectar levaduras y mohos contienen a menudo componentes que inhiben el crecimiento de microbios bacterianos que crecen por lo demás más rápidamente.

10

También debe elegirse un método para generar una señal detectable a partir de las células que van a detectarse. La elección de la señal depende del tipo de células en las microcolonias que van a detectarse, de los tipos de otras células que podrían formar microcolonias y del tipo de fondo esperado en la muestra. Considérese una prueba para determinar el número total de bacterias aerobias en un producto terminado en la fabricación farmacéutica; una disolución de lavado para lentes de contacto, por ejemplo. Debido a que un amplio espectro de miles de microbios medioambientales podría estar presente en una muestra de este tipo, el método de generación de la señal debe ser muy general. Algunos de tales métodos se basan en las propiedades ópticas intrínsecas de las microcolonias, tales como autofluorescencia, reflectancia o absorbancia de infrarrojos de las microcolonias. Tales métodos permiten una detección de microcolonias rápida sin usar un reactivo, una ventaja importante de la invención. La generación de la señal sin reactivos usando, por ejemplo, la autofluorescencia de las microcolonias, simplifica sustancialmente los métodos de prueba, permite un procesamiento aséptico de la muestra y facilita pruebas rápidas que usan los mismos medios y productos desechables usados en los "métodos de referencia". Alternativamente, las microcolonias generadas mediante las células diana pueden marcarse usando tinciones.

15

20

25

Uso de sondas específicas y tinciones para enumerar categorías específicas de células diana

El uso de tinciones o sondas que se unen a constituyentes moleculares de células diana puede usarse en aplicaciones que formulan una variedad de cuestiones de diagnóstico. Los ejemplos de tinciones que pueden usarse para detectar una amplia variedad de células diana (por ejemplo, todas las bacterias aerobias) incluyen tinciones de ácido nucleico (por ejemplo, yoduro de propidio o Syber Green (Molecular Probes)), y tinciones para detectar actividad enzimática (por ejemplo, tinciones de esterasas fluorogénicas). Para marcar categorías más estrechas de células diana, pueden usarse sondas marcadas que se unen a constituyentes moleculares específicos de diana. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo marcado de manera fluorescente que se une específicamente a una molécula que sólo se produce en la superficie del patógeno alimentario *E. coli* O157:H7 para detectar microcolonias patógenas en una muestra de alimentos.

30

35

Por tanto, para detectar la presencia de una categoría de células diana, la invención puede usar moléculas que se

unen específicamente a constituyentes moleculares específicos de categoría. Los constituyentes moleculares específicos de categoría que se producen en células diana se denominan sitios de unión específicos de categoría y las moléculas que se unen específicamente a ellos se denominan moléculas de unión a una categoría. Para detectar la unión de moléculas de unión a una categoría, se une generalmente un marcador detectable, o resto de señalización, a las moléculas de unión a una categoría. Obsérvese que los sitios de unión específicos de categoría son una propiedad de células diana que están potencialmente presentes en la muestra que va a someterse a prueba. En cambio, las moléculas de unión a una categoría son un reactivo proporcionado en un kit de prueba de diagnóstico.

Una ventaja de la invención es que puede usarse un amplio espectro de moléculas de unión a una categoría. Esta característica es importante dado que se usan diferentes tipos de moléculas de unión a una categoría para formular diferentes tipos de cuestiones de diagnóstico (por ejemplo, investigación amplia a nivel de reino frente a identificación estrecha a nivel de subespecie). Las clases de moléculas de unión a una categoría (también denominadas algunas veces sondas) comprenden: ácidos nucleicos (oligonucleótidos, aptámeros, secuencias clonadas, ADN genómico, ARN, etc.); variantes químicas relacionadas con ácidos nucleicos, tales como ácidos nucleicos peptídicos (ANP); anticuerpos; enzimas (que pueden unirse a sustratos diana); proteínas no enzimáticas tales como avidina (que se une a la molécula diana biotina), moléculas que se unen a constituyentes celulares específicamente (por ejemplo, faloidina que se une a actina o biotina que se une a avidina); colorantes y tinciones, (por ejemplo, yoduro de propidio, auramina-rodamina, o SYTO 17); ligandos (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico); y reactivos de unión a polipéptidos o ácidos nucleicos que se han seleccionado usando técnicas de evolución *in vitro* (por ejemplo, Zhang *et al.*, Nat. Biotech. 18: 71-74, 2000).

Las moléculas de unión a una categoría pueden incorporar otras modificaciones o dominios funcionales. Por ejemplo, las moléculas de unión a una categoría están a menudo asociadas covalente o no covalentemente con restos de señalización (es decir, dominios de marcaje tales como un fluoróforo o una micropartícula teñida) o restos de selección (por ejemplo, partículas magnéticas o superficies sólidas). Alternativamente, una molécula de unión a una categoría puede estar unida a un resto adaptador que, a su vez, facilita la unión a otro resto funcional. Algunas veces la molécula de unión a una categoría tiene funciones no separables dobles. Por ejemplo, puede usarse yoduro de propidio, una tinción de ácido nucleico, como molécula de unión a una categoría (por ejemplo, el sitio de unión específico de categoría puede ser el ácido nucleico celular en una levadura) mientras que, al mismo tiempo, el colorante unido funciona como resto de señalización (es decir, puede fluorecer cuando se une al sitio de unión específico de categoría). Las pruebas basadas en la invención pueden incorporar más de una clase de molécula de unión a una categoría (por ejemplo, anticuerpos y tinción de ácido nucleico, o anticuerpos y oligonucleótidos).

Las pruebas más sencillas incorporan un único tipo de molécula de unión a una categoría para explorar para detectar una única categoría de célula diana. Por ejemplo, una prueba para detectar *M. tuberculosis* puede usar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un sitio de unión específico de categoría en la superficie de *M. tuberculosis*. En otro ejemplo, cuando se explora para detectar infecciones del tracto urinario, la única categoría es "todas las células" (o, si se lisan células humanas, "todas las células no humanas") y el único tipo de molécula de unión a una categoría puede ser una tinción de ácido nucleico (por ejemplo, yoduro de propidio).

Una familia de moléculas de unión a una categoría es un grupo de moléculas de unión a una categoría distintas que se unen a miembros de la misma categoría de células diana. Por ejemplo, un anticuerpo policlonal producido frente al virus de la hepatitis C es una familia de anticuerpos dado que comprende múltiples moléculas de unión a una categoría que se unen específicamente a la misma categoría de células diana, en este caso VHC. Otro ejemplo de una familia de moléculas de unión a una categoría es un grupo de 80 secuencias de ADN genómico específicas de categoría que se producen en todas las cepas de *E. coli* O157:H7 pero que no se producen en miembros de otros grupos de bacterias. Esta familia de moléculas de unión a una categoría pueden hibridarse como grupo a células *E. coli* O157:H7 preparadas adecuadamente pero no se hibridan a otros tipos de células.

Para detectar múltiples categorías de células diana, una prueba incluye una familia de moléculas de unión a una categoría para cada categoría. Un grupo de familias de moléculas de unión a una categoría se denomina conjunto de moléculas de unión a una categoría. Por ejemplo, las pruebas de neumonía o las pruebas de consumo de drogas deben distinguir numerosas categorías de células diana entre sí. Se usa una familia de moléculas de unión a una categoría para cada categoría de células diana. Para una prueba de neumonía, puede usarse un conjunto de anticuerpos que reaccionan frente a antígenos específicos de categoría en la superficie de microbios que provocan neumonía. Una familia de este conjunto de moléculas de unión a una categoría puede comprender anticuerpos policlonales procedentes de la fracción de inmunoglobulinas de antisuero producido en un huésped conejo y dirigidos contra *Streptococcus pneumoniae*. Otra familia puede comprender un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal dirigido contra una proteína de recubrimiento de adenovirus.

El número de grupos o categorías distintas de células diana sometidas a prueba mediante un conjunto, es decir, la complejidad categórica, está reflejada por el número de familias de moléculas de unión a una categoría en el conjunto. A su vez, el número de familias en un conjunto puede definirse con exactitud mediante una cantidad denominada la "derivación categórica mínima" de un conjunto. La complejidad de familia es el número mínimo de células diana distintas que se requiere que se una a miembros de cada una de las familias de moléculas de unión a

- una categoría en el conjunto de prueba. Por ejemplo, considérese un conjunto de anticuerpos específicos de categoría usados para someter a prueba simultáneamente una muestra de esputos para detectar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella spp* y *Coccidioides immitis*. La complejidad de familia del conjunto sería de tres, dado que se requeriría que un mínimo de tres células diana, una de cada categoría de patógeno, se unan a miembros de cada familia de moléculas de unión a una categoría en el conjunto. La capacidad de la invención para identificar un amplio espectro de categorías de células diana en una única prueba es una consecuencia de su capacidad para explorar una muestra usando un conjunto de moléculas de unión a una categoría que tiene una gran complejidad de familia.
- Las moléculas de unión a una categoría usadas junto con la invención deben ser específicas porque deben unirse en condiciones de ensayo a la célula diana deseada pero no a otros tipos de células diana que se pretende distinguir mediante el ensayo o a otros posibles constituyentes de la muestra o prueba. Por tanto, en una prueba para infección bacteriana de las vías respiratorias superiores, se exploran potenciales moléculas de unión a una categoría para eliminar aquellas que reaccionan de manera cruzada con constituyentes microbianos normales (comensales) de las vías respiratorias superiores.
- Se incluyen en los ejemplos a continuación métodos representativos para obtener y caracterizar moléculas de unión a una categoría.
- La capacidad de la invención para analizar una muestra para detectar numerosas categorías dispares de células diana simultáneamente proviene de la capacidad para diferenciar las señales que provienen de las diferentes categorías de células diana. La invención distingue entre categorías marcando cada familia específica de categoría de moléculas de unión a una categoría con restos de señalización de manera que tiene una firma de señal única. La capacidad para generar y detectar grandes números de firmas de señal distintas (es decir, altas complejidades de señal) permite la construcción de pruebas que analizan para detectar numerosas categorías de células diana (es decir, pruebas sumamente multiplexadas).
- La invención puede aprovecharse de diversos tipos de carácter de señal incluyendo: fluorescencia, luz dispersada, polarización de luz, quimioluminiscencia y radiactividad. Aparecen a continuación ejemplos de restos de señalización y esquemas de detección usando diversos caracteres de señal. Puede haber múltiples clases de señal dentro de un carácter de señal. Por ejemplo, si el carácter de señal es la fluorescencia, se incluyen diversos espectros de emisión característicos en las clases de señal (por ejemplo, fluorescencia roja, fluorescencia verde y fluorescencia azul). En otro ejemplo, considérense micropartículas fluorescentes rojas que se tiñen con diferentes concentraciones del mismo fluoróforo. En este caso, la fluorescencia es el carácter de señal, pero las diferentes intensidades de las partículas constituyen las clases del carácter de señal, es decir, la intensidad de fluorescencia es la cualidad del carácter de señal que diferencia un grupo de partículas de otro.
- Puede usarse una gran variedad de restos de señalización junto con la invención tal como se demuestra en los ejemplos a continuación. Los restos de señalización pueden incluir fluoróforos sencillos, fósforos regulados por incremento, proteínas fluorescentes de manera natural (tales como proteína fluorescente verde y sus relacionadas), colorantes, sistemas de enzima:substrato (que generan cambios de color o quimioluminiscencia), micropartículas fluorescentes, partículas de dispersión de luz, partículas magnéticas o microdispositivos radiotransmisores.
- Conseguir una alta *complejidad de señal* es clave para desarrollar ciertas pruebas que exploran numerosos tipos de células diana (es decir, pruebas con alta *complejidad categórica*).
- Logro de una alta complejidad de señal
- El número de marcas distinguibles (o restos de señalización) en una mezcla se denomina *complejidad de señal*. Para pruebas sumamente multiplexadas, algunas veces es ventajoso usar restos de señalización con alta complejidad de señal. Tres enfoques generales que pueden usarse con esta invención para generar alta complejidad de señal son: (1) marcaje de distinción, (2) marcaje combinatorio y (3) marcaje en razón.
1. Para un marcaje de distinción, se etiquetan sondas de diferentes familias de sondas con un único resto de señalización que puede detectarse fácilmente en presencia de todos los demás restos de señalización en el experimento. Hasta el momento, ha sido difícil lograr un marcaje de distinción a altas complejidades de señal. Esta dificultad está presente debido a que la mayoría de los métodos de marcaje usan señales ópticas (por ejemplo, cromogénicas, fluorescentes, quimioluminiscentes) o marcaje radiactivo, y debido al ancho de banda espectral de señales ópticas y el intervalo limitado de señales detectables mediante los instrumentos actuales, la complejidad de señal resoluble usando señales ópticas es bastante pequeña. Por ejemplo, la resolución de docenas de fluoróforos con espectros de emisión distintos es actualmente imposible debido al solapamiento espectral.
2. Otra forma de lograr la alta complejidad de señal usada en la invención es aplicar un enfoque de marcaje combinatorio. El marcaje combinatorio es una técnica para lograr una alta complejidad de señal usando un número relativamente pequeño de restos de señalización distintos. Con este enfoque, se unen diferentes *combinaciones* de restos de señalización a diferentes dianas. Actualmente, los fluoróforos son una clase favorecida de restos de señal para diagnósticos moleculares. Sin embargo, dadas las complicaciones implicadas al analizar múltiples fluoróforos distintos (que surgen en gran parte del solapamiento de los espectros de excitación y emisión), actualmente sólo es

práctico incorporar aproximadamente siete o menos fluoróforos convencionales. Sin embargo, usados en combinación, pueden usarse siete fluoróforos para generar 127 señales distintas (N fluoróforos generan 2^N-1 combinaciones). También puede lograrse una alta complejidad de señal mediante marcaje combinatorio usando otros tipos de restos de señalización. Por ejemplo, pueden usarse con este enfoque partículas impregnadas con diferentes colorantes, partículas que se encuentran dentro de diferentes clases de tamaño diferenciado o transpondedores que emiten señales de radio distintas. El marcaje combinatorio usando fluoróforos se ha aplicado recientemente con éxito para el cariotipado de seres humanos (Speicher *et al* 1996, *supra*; Schröck *et al* 1996, *supra*). La instrumentación y el software para el análisis de experimentos de marcaje combinatorio están comercialmente disponibles.

3. También puede obtenerse una alta complejidad de señal usando el enfoque de marcaje en razón (Fulton, *et al* 1997, *supra*). En el marcaje en razón, como en el marcaje combinatorio, se generan muchos tipos distintos de restos de señalización usando un número relativamente pequeño de elementos de señalización distintos. Sin embargo, en contraposición al marcaje combinatorio, los restos de señalización en el marcaje en razón se distinguen mediante la razón de los elementos de señalización. Por ejemplo, pueden usarse dos fluoróforos, X e Y, con diferentes características de excitación/emisión para teñir partículas de poliestireno. Se aplican diferentes concentraciones relativas de los fluoróforos ([X], [Y]) a diferentes grupos de partículas. Por ejemplo, pueden usarse ocho concentraciones diferentes de X y ocho concentraciones diferentes de Y para teñir partículas en todas las combinaciones ($X_1Y_1, X_1Y_2, X_8Y_7, X_8Y_8$) dando como resultado 64 clases de partículas distinguibles. El marcaje en razón simplifica la instrumentación, ya que sólo necesita usarse un pequeño número de tipos de señal. También pueden usarse elementos de señal, diferentes de fluoróforos y que incluyen elementos de señal no ópticos, para generar altas complejidades de señal usando un enfoque de proporción de marcaje.

Generación de señales intensas para facilitar la detección de microcolonias

El nivel de intensidad de señal necesario depende, por supuesto, del tipo de carácter de señal y de la instrumentación/el método de detección (véase a continuación).

Pueden usarse diversos enfoques para marcar moléculas de unión a una categoría para lograr la sensibilidad requerida. Un método para optimizar la intensidad de señal es marcar moléculas diana con restos de señalización sumamente fluorescentes. Por ejemplo, puntos cuánticos, nanoesferas teñidas de manera fluorescente y moléculas de fluoróforo polimerizadas generan señales fluorescentes intensas. La incorporación de numerosos elementos de señal puede aumentar la intensidad de la fluorescencia de un resto de señalización. Por ejemplo, las nanoesferas fluorescentes (de ~20 nm de diámetro; Molecular Probes) pueden generar una señal equivalente a aproximadamente 180 moléculas de fluoresceína. Las micropartículas de poliestireno teñidas de manera fluorescente (por ejemplo, de 1 μm de diámetro) pueden incorporar millones de elementos de señalización de fluoróforo. Un método para incorporar múltiples fluoróforos en un resto de señal que se asocia con una molécula de unión a una categoría de ácido nucleico es incorporar conjugados de fluoróforo-dNTP durante la amplificación por PCR de una secuencia clonada específica de categoría. Los métodos alternativos para incorporar múltiples fluoróforos en moléculas de unión a una categoría de ácido nucleico incluyen enfoques que usan: dendrímeros, ADN ramificado o moldes de círculo rodante unidos a múltiples restos de señal, o la adición de una cola con numerosos nucleótidos marcados con fluoróforos polimerizados. La conjugación de moléculas de unión a una categoría con múltiples restos de señalización también aumenta la intensidad de señal. Por ejemplo, también puede lograrse la amplificación de la señal conjugando grandes números de enzimas de señalización (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa del rábano) a una nanopartícula.

Otro enfoque para obtener señales intensas es unir numerosas moléculas de unión a una categoría marcadas a cada célula. Esta unión puede lograrse mediante diversos medios incluyendo: el uso de múltiples moléculas de unión a una categoría (que reconocen múltiples sitios de unión específicos de categoría en la misma célula diana) o mediante la elección de moléculas de unión a una categoría que se unen a moléculas diana que están sumamente representadas en una célula diana. Por ejemplo, un anticuerpo policlonal específico de microbio marcado puede lograr altas intensidades de señal uniéndose a numerosos epítopos distintos en una célula diana microbiana. La estrategia de elegir sitios de unión específicos de categoría que están presentes en grandes números en cada célula diana se ha usado de manera frecuente anteriormente. Los ejemplos de esta estrategia incluyen el uso de sondas de ácido nucleico para ARN ribosómico (que dependiendo del organismo diana y del tipo celular puede estar presente en miles de copias por célula). De manera similar, algunas moléculas diana antigénicas están presentes en cientos o miles de copias en cada célula de un organismo diana. La invención puede aprovecharse de ambas de estas estrategias. Como otro ejemplo, el gran número de sitios de unión específicos de categoría presentes en una bacteria proporcionan una gran intensidad de señal cuando se usa el colorante fluorescente de unión a ácido nucleico Syber Green I como resto de señalización/molécula de unión a una categoría.

La unión de numerosos restos de señal a una célula diana no sólo aumenta la intensidad de señal, sino que también dota a la invención de robustez dado que las posibilidades de observar numerosos agrupamientos de un gran número de restos de señalización con la firma de señal compuesta esperada en ausencia de la célula diana son pequeñas.

Conjugación de restos de señalización a moléculas de unión a una categoría

La invención puede incorporar numerosos tipos de restos de señalización que pueden conjugarse directamente con moléculas de unión a una categoría usando diversos métodos que conocen los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, G., *Bioconjugate Techniques* (Academic Press, 1996) y ejemplos específicos a continuación). Por ejemplo, pueden conjugarse directamente moléculas de unión a una categoría de anticuerpo u oligonucleótido con un resto de señalización de fluoróforo o punto cuántico. Alternativamente, pueden usarse moléculas de unión a una categoría de oligonucleótido o anticuerpos para recubrir restos de señalización a base de nanopartículas de dispersión de luz o a base de micropartículas fluorescentes. Pueden conjugarse indirectamente restos de señalización con moléculas de unión a una categoría. Por ejemplo, puede conjugarse directamente avidina con múltiples elementos de señal para constituir un resto de señalización. La molécula de avidina marcada puede unirse entonces a un anticuerpo específico de categoría biotinilado. Pueden conjugarse restos de señalización con las moléculas de unión a una categoría antes, durante o tras las etapas de unión. Por ejemplo, en una realización de la invención, se usan sondas de ácido nucleico marcadas con digoxigenina como moléculas de unión a una categoría. Tras unir las moléculas de unión a una categoría a los sitios de unión específicos de categoría en las células diana en la muestra, las sondas no unidas se eliminan por lavado. Se conjugan entonces conjugados de anticuerpo antidigoxigenina:fosfatasa alcalina (los restos de señalización) con las sondas marcadas con digoxigenina unidas. Se añade entonces un sustrato de fosfatasa alcalina (por ejemplo, el sustrato quimioluminiscente CDP-Star; NEN) a la fosfatasa alcalina unida para generar la señal.

Etapas 2: Deposición de las dianas celulares en el área de detección

La deposición de las células diana de la muestra en la zona de detección es generalmente la siguiente etapa en aplicaciones basadas en la invención. Se usan a menudo zonas de detección esencialmente planas, en parte, debido a que los sistemas ópticos de obtención de imágenes pueden recoger eficazmente la luz de zonas de detección delgadas (es decir, sistemas ópticos con una pequeña profundidad de campo), por ejemplo, cuando se hacen crecer microcolonias en la superficie del agar nutritivo o sobre membranas que se encuentran en la superficie de placas de agar nutritivo. En estos casos, la profundidad de la zona de detección puede ser insignificante en comparación con las dimensiones laterales de la zona de detección. Esta etapa también puede usarse para depositar ciertas células diana selectivamente, para eliminar sustancias que podrían inhibir el crecimiento celular o para poner en contacto células diana con reactivos de marcaje.

El uso de la filtración por membrana para depositar células sobre una superficie de detección de membrana aproximadamente plana tiene varias ventajas. La capacidad para recoger pequeños números de células diana a partir de grandes volúmenes de muestra es una ventaja importante del uso de la filtración por membrana. Por ejemplo, puede depositarse rápida y eficazmente una única célula bacteriana en 1 litro de agua en la superficie de membranas de filtración estándar. El agua puede pasar libremente a través de las membranas pero las células no pueden, debido al tamaño de los poros de la membrana. La muestra de agua se vierte en un recipiente cuya base forma una membrana y entonces se aplica vacío a la superficie del fondo de la membrana. Se extrae el agua a través de la membrana mientras que las células se retienen en la superficie de la membrana. La membrana puede lavarse opcionalmente con líquido para eliminar eficazmente sustancias tales como inhibidores del crecimiento o para exponer células a reactivos de marcaje. La membrana puede colocarse entonces en medios de crecimiento.

Otros métodos para depositar las células diana en una superficie incluyen centrifugación, sedimentación gravitacional, selección magnética o unión a moléculas de unión a una categoría unidas a superficie (por ejemplo, anticuerpos de captura). En algunos casos (por ejemplo, separación magnética) se usa un resto distinto, el resto de selección. Micropartículas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos de categoría son un ejemplo de un resto de selección. Tras dejar que las células diana se unan a las partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos, se aplica un campo magnético para depositar las células marcadas de manera magnética en la superficie de detección. De manera similar, pueden usarse micropartículas densas recubiertas con anticuerpos específicos de diana como restos de selección. En este caso, las células marcadas se llevan a la superficie de detección mediante la acción de la gravedad sobre las partículas densas.

Etapas 3: Permitir la replicación celular para formar microcolonias

En esta etapa, las células diana forman microcolonias mediante división en su sitio en la zona de detección. El crecimiento de las microcolonias está ayudado por la exposición de células a medio de crecimiento que contiene nutrientes y la incubación de las mismas en condiciones que promueven el crecimiento y la división celulares (estos parámetros se seleccionan en la etapa 1 anterior). En una realización típica, las células se depositan sobre un filtro de membrana porosa. El filtro se coloca sobre la superficie de medio de crecimiento de agar nutritivo solidificado en una placa de Petri, que entonces se cubre y se coloca en un incubador fijado a la temperatura apropiada. Este método se usa en la actualidad ampliamente para ayudar al crecimiento de colonias usando cultivo microbiano tradicional porque los nutrientes pueden difundir libremente a través de la membrana sin producir movimiento de células hijas procedentes de la célula progenitora. Alternativamente, pueden hacerse crecer microcolonias directamente en la superficie de medio de agar nutritivo o el equivalente.

La selección para el crecimiento específico de las células diana puede producirse en la etapa de crecimiento de microcolonias. Por ejemplo, puede diseñarse una prueba para detectar bacterias anaerobias en una muestra (se requiere generalmente una prueba de este tipo para productos terminados farmacéuticos inyectables, por ejemplo).

En este caso, la etapa de crecimiento puede llevarse a cabo en una atmósfera anaerobia en una campana. También pueden usarse medios de crecimiento selectivo para lograr un crecimiento microbiano selectivo en esta etapa. Para detectar resistencia bacteriana a antibióticos, por ejemplo, se incuban las células generalmente en presencia de diversos antibióticos a varias concentraciones. La resistencia a una cierta concentración de antibiótico se deduce si una cepa bacteriana crece de manera comparable en presencia y ausencia de antibiótico a esa concentración.

La invención puede detectar diversas morfologías de colonias. Muchos tipos de células en crecimiento forman colonias con forma de cúpula diferenciadas sencillas sobre sustratos comunes (medios de agar nutritivo y membranas). Otras forman colonias con forma irregular o colonias filamentosas. Además, la morfología de las colonias puede depender de las condiciones de crecimiento (por ejemplo, nutrientes, temperatura y sustrato). Algunos tipos de células son móviles y no forman colonias diferenciadas en absoluto. Si es importante detectar el crecimiento de tales organismos, pueden añadirse inhibidores de la motilidad al medio. Por tanto, deben elegirse las condiciones de crecimiento y llevarse a cabo experimentos de control para garantizar que las células diana forman microcolonias detectables. Si es necesario, pueden modificarse las condiciones de crecimiento o pueden usarse múltiples condiciones en pruebas en paralelo.

Etapa 4: Marcaje opcional de microcolonias

En esta etapa opcional, se ponen en contacto moléculas de unión a una categoría y restos de señalización asociados (también denominados las sondas, los marcadores o las tinciones) con células diana en la muestra bajo condiciones que facilitan la unión específica. Por ejemplo, un conjunto de secuencias de ácido nucleico específicas de categoría se hibrida con secuencias diana complementarias en la muestra en esta etapa. De manera similar, se deja que se unan antígenos específicos de categoría en la muestra a los anticuerpos específicos de categoría correspondientes.

Hay varias configuraciones físicas posibles para la etapa de unión y la unión puede llevarse a cabo en diversos puntos en el procedimiento de prueba. Por ejemplo, pueden marcarse células diana en una muestra líquida antes de depositar las células diana en la zona de detección. Entonces pueden eliminarse eficazmente las sondas no unidas durante la etapa de deposición o mediante lavado. Una desventaja de este enfoque es que generalmente la señal no aumenta con el crecimiento microbiano. Se obtienen generalmente señales más intensas marcando las microcolonias durante o tras el crecimiento microbiano. El reactivo de marcaje puede añadirse a los medios nutritivos de modo que los microbios se exponen de manera continua al reactivo durante el crecimiento. Alternativamente, las microcolonias pueden exponerse a las sondas tras el crecimiento. Por ejemplo, pueden fijarse generalmente las microcolonias sobre una membrana y exponerse los sitios de unión específicos de categoría relevantes mediante secado, calentamiento y/o exposición a compuestos químicos (por ejemplo, NaOH o vapor de cloroformo). Entonces puede efectuarse el marcaje solapando las microcolonias con el reactivo de marcaje o colocando la membrana sobre una almohadilla que se ha saturado con el reactivo. Generalmente, se usa una etapa de lavado para eliminar el reactivo no unido. La concentración de las moléculas de unión a una categoría se optimiza para lograr una cinética de unión rápida. Las condiciones elegidas para la selección para detectar una unión específica dependen de las características de las moléculas de unión a una categoría y sus interacciones con moléculas diana. En los ejemplos a continuación se describen procedimientos y condiciones específicas.

Etapa 5: Enumeración de las microcolonias

La enumeración de las células diana en la muestra se produce en la etapa final de aplicaciones de pruebas basadas en la invención. La etapa de enumeración comprende por sí misma las etapas de obtención de imágenes, análisis de imágenes y generación de informe.

La invención puede detectar colonias *microscópicas sin aumento*. La obtención de imágenes con poco aumento facilita la obtención de imágenes de una gran área que, a su vez, facilita la exploración de grandes muestras. Algunas realizaciones de la invención detectan colonias microscópicas sin aumento, en parte, usando una óptica de alta eficacia para dirigir fotones emitidos por la microcolonia hacia un pequeño número de píxeles de matrices fotodetectoras.

El método de obtención de imágenes usado depende del tipo de generación de la señal elegido en la etapa 1. Por ejemplo, el procedimiento de obtención de imágenes es diferente dependiendo de la propiedad óptica o el carácter de señalización que se usa para la generación de la señal. Para algunos caracteres de señal (por ejemplo, reflectancia, fluorescencia, dispersión de luz, absorbancia), los complejos en la zona de detección deben iluminarse mediante una fuente de luz. Para otros (por ejemplo, quimioluminiscencia, radiación térmica), no se requiere iluminación. Pueden usarse diversos detectores incluyendo fotodetectores electrónicos, película y visualización directa.

La detección de microcolonias individuales es, naturalmente, cuantitativa y ultrasensible. La cuantificación puede llevarse a cabo manualmente contando células individuales en una imagen fotográfica o digital o usando análisis de imágenes automatizado de imágenes digitalizadas. También puede usarse la integración de la intensidad de señal con respecto a la muestra para cuantificar las células diana. La integración de la señal es particularmente útil con muestras que contienen altas concentraciones de células diana. En estos casos, la resolución de señales

coincidentes puede no ser siempre posible.

La descodificación de las firmas de familias de sondas marcadas permite la identificación de numerosas categorías de células diana. Un objetivo importante de esta etapa es identificar la categoría de células diana en la muestra determinando la firma de moléculas de unión a una categoría marcadas que se han adherido a la muestra.

5 El dispositivo de obtención de imágenes basado en una cámara de CCD, mostrado en la figura 3, es un dispositivo útil para la obtención de imágenes de grandes áreas que se usa cuando se usa la fluorescencia como carácter de
 10 señal. Este dispositivo se usó para recoger los datos para muchos de los ejemplos a continuación. La luz de excitación puede proporcionarse mediante la introducción de luz de una fuente de luz blanca de alta intensidad (lámpara de arco de xenón de 1000 vatios, modelo A-6000, Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ) en una guía de luz líquida (diámetro de núcleo de 5 mm, modelo 380, Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ). La guía de luz líquida lleva la luz hasta una rueda de filtros de excitación (BioPoint FW, Ludl Electronics, Hawthorne, NY) y dirige el rayo filtrado (por ejemplo, de 9 mm o más de diámetro) sobre la
 15 superficie de detección que contiene las microcolonias. El aparato puede detectar microcolonias en diversas configuraciones (por ejemplo, en las superficies de agar nutritivo, portaobjetos de microscopios, cubreobjetos o tubos o pocillos con fondos planos, ópticamente transparentes; o inmovilizadas en agar nutritivo u otras sustancias). La luz incidente golpea la superficie de detección induciendo fluorescencia en las células diana. Una parte de la luz fluorescente emitida se recoge mediante un sistema de lentes de alta eficacia de recogida y se transmite a través de una rueda de filtros de emisión (BioPoint FW, Ludl Electronics) hasta una cámara de CCD (Orca II, Hamamatsu, Bridgewater, NJ). El diseño y la construcción del tren óptico se basan en principios y prácticas conocidas por los
 20 expertos en la técnica.

La invención también puede incorporar otros tipos de fotodetectores y otras configuraciones. La sensibilidad del sistema de obtención de imágenes puede aumentarse eligiendo una cámara más sensible (por ejemplo, una cámara refrigerada hasta una temperatura inferior, o una cámara que usa un chip con parte posterior más delgada). Alternativamente, la sensibilidad y resolución de la detección puede aumentarse implementando un sistema de
 25 barrido en línea (por ejemplo, BT Image Array; Hamamatsu). Para el barrido en línea, se usa una CCD lineal o matriz de fotodiodos (por ejemplo, 1 x 500 ó 1 x 1000 píxeles) para capturar la imagen. La resolución en una dimensión corresponde al número de elementos de la matriz, mientras que la segunda dimensión se captura generalmente moviendo el portaobjetos de la muestra perpendicularmente bajo la matriz lineal. Dado que hay menos elementos, las matrices lineales de sensibilidad similar son normalmente menos caras que las cámaras de CCD de formato de
 30 área.

El instrumento representado en la figura 3 facilita la medición de señales a partir de múltiples muestras usando una platina de posicionamiento X-Y (BioPoint XY, Ludl Electronics) para mover el recipiente de la muestra (por ejemplo, placa de microtitulación) a lo largo de la óptica de excitación y de recogida. Image-Pro y los complementos de
 35 Image-Pro controlan todos los componentes de instrumento y la adquisición de imágenes. Las ruedas de filtros se manejan con el complemento de ScopePro (Media Cybernetics, Baltimore MD), y el complemento de StagePro (Media Cybernetics, Baltimore MD) maneja el posicionamiento de la platina, mientras que el control de la cámara es a través del controlador Hamamatsu Orca II (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). También se usa Image-Pro Plus para el análisis y el procesamiento de imágenes tal como se describe a continuación.

Las realizaciones de la invención que usan iluminación con luz blanca utilizan filtros espectrales para proporcionar un pico de excitación óptimo para cada uno de los fluoróforos. El espectro de luz blanca es grande, permitiendo que se seleccione una amplia variedad de fluoróforos para eliminar solapamiento del espectro de emisión. Normalmente, los tamaños de puntos que pueden lograrse con iluminadores de luz blanca, por ejemplo, de 2 mm a 5 mm, son apropiados para la obtención de imágenes de grandes áreas. Dado que los cambios de filtro son relativamente sencillos, y pueden automatizarse, los sistemas de luz blanca son muy adaptables, permitiendo que el mismo
 40 aparato se use para pruebas que usan distintos grupos de fluoróforos.

La eficacia de recogida del sistema mostrado en la figura 3 se maximiza incorporando una óptica de recogida diseñada a medida que consiste en dos componentes: un objetivo de recogida y un elemento de enfoque. El objetivo de recogida tiene una alta eficacia de recogida ($\geq f\#1,2$) y produce un rayo relativamente colimado. La lente de enfoque captura la salida de luz del objetivo de recogida y la enfoca sobre la superficie de detección de la CCD. La
 50 óptica está diseñada en dos partes para permitir que se inserte una rueda de filtros en la trayectoria de la lente de recogida. Para ciertas realizaciones de la invención, por ejemplo para algunas realizaciones que no requieren cambios de filtro, puede ser deseable incluir un haz de fibras ópticas de sección decreciente para lograr una alta eficacia de recogida. El haz de fibras ópticas contiene fibras que recogen luz de manera proximal a la muestra y canalizan la luz directamente hasta un chip de CCD. Alternativamente, la invención puede detectar señales de
 55 manera muy sensible usando una detección proximal directa en la que la muestra se aplica directamente en o en proximidad estrecha al chip de CCD (para la mayor sensibilidad a la parte posterior de un chip de CCD con parte posterior más delgada).

Además del sistema multiespectral, de luz blanca, descrito anteriormente, también se ha desarrollado un sistema de obtención de imágenes de fluorescencia de un único color más sencillo para la obtención de imágenes de grandes
 60 áreas no aumentadas. En el sistema mostrado en la figura 4, la luz de excitación se proporciona mediante un láser

de diodo de doble frecuencia de 532 nm (50 mW, modelo número BWT-50E, B&W Tek, Newark, DE). Dado que esta detección usa un único color, no son necesarias ruedas de filtros. Un único filtro de excitación elimina los armónicos de la salida de láser (modelo HQ532/10x, Chroma Technology, Brattleboro, VT) y un único filtro de emisión (modelo HQ620/60m, Chroma Technology, Brattleboro, VT) permite que sólo las señales fluorescentes específicas pasen hasta la cámara de CCD. El sistema también usa una cámara de CCD menos cara (modelo KX-2E, Apogee CCD, Auburn, CA) que la descrita anteriormente, para capturar imágenes. El instrumento puede adaptarse fácilmente al análisis multicolor incorporando múltiples láseres y grupos de filtros.

Las cámaras de CCD incorporadas en la invención se refrigeran generalmente hasta una temperatura de entre -5°C y -50°C, suficiente para tiempos de integración de desde diez segundos hasta aproximadamente dos minutos (dependiendo de la sensibilidad de la cámara) con una acumulación de ruido de la cámara mínima. Tiempos de integración más largos proporcionan generalmente una sensibilidad superior permitiendo la recogida de los fotones emitidos desde los fluoróforos durante un periodo prolongado. Los tiempos de integración largos son inapropiados para el barrido en línea; sin embargo, están disponibles matrices lineales con la parte posterior más delgada que tienen eficacias cuánticas muy altas, lo que aumenta la sensibilidad.

La invención también puede usar la obtención de imágenes espectrales basada en interferómetro para la detección y descodificación de señales (Schrock, E., 1997, *supra*). Al usar esta técnica, la luz emitida o dispersada por restos de señalización se divide en dos trayectorias, pasa a través de prismas (de modo que las diferentes longitudes de onda recorren diferentes distancias) y se deja que se recombine para crear un patrón de interferencia. El análisis de Fourier del patrón de interferencia genera un espectrógrafo para cada punto en la imagen.

Alternativamente, puede usarse una película fotográfica para registrar imágenes de las células diana de manera barata en una muestra. Cuando el carácter de señalización es la quimioluminiscencia, este enfoque es el más fácilmente implementado. Las imágenes recogidas en la película pueden digitalizarse en escáneres comerciales para el almacenamiento de datos y para el análisis de imágenes digitales.

Para realizaciones de la invención que generan imágenes digitales, el software informático identifica y cuantifica las microcolonias diana. Para un ensayo típico en el que se usan diferentes clases de restos de señalización fluorescentes, el software superpone las imágenes específicas de fluoróforo apropiadas, identifica las células diana determinando qué firma o combinación de señales se emite por cada microcolonia diana y enumera cada categoría de microcolonia diana que está presente en la muestra. El software también puede: (1) corregir una iluminación no uniforme; (2) corregir una diafonía de fluorescencia a través de una matriz de desconvolución; (3) alinear imágenes usando marcas de registro impresas sobre el sustrato; (4) comparar imágenes de diferentes puntos de tiempo; (5) aplicar algoritmos para distinguir microcolonias en crecimiento de objetos que no están en crecimiento; (6) asignar un código de ID a cada microcolonia de la que se obtuvieron imágenes en la muestra basándose en la comparación con una tabla de consulta; (7) registrar el código de barras de la muestra de la que se obtuvieron imágenes para la identificación de la muestra; y (8) guardar automáticamente los datos de entrada, las imágenes y el código de barras en una base de datos que puede consultarse, por ejemplo, a través de una interfaz de navegador web. Pueden usarse paquetes de análisis de imágenes comercialmente disponibles para proporcionar estas funciones. Pueden usarse paquetes de software para el análisis de imágenes multicolores (por ejemplo, Image-Pro, Media Cybernetics; MetaMorph, Universal Imaging; MatLab; The MathWorks).

Es útil explicar resumidamente aquí los paquetes de software y los métodos que se usaron para analizar los datos de fluorescencia recogidos en muchos de los ejemplos que siguen. Se obtuvieron imágenes de la superficie de detección para determinar el número de objetos fluorescentes y/o la señal fluorescente total. La fluorescencia se capturó a partir de la membrana mediante una cámara de CCD y se almacenó como un archivo de imagen TIFF ("*Tagged Image File Format*", formato de archivo de imagen etiquetada) que contenía registros de intensidades y ubicaciones de píxeles. Se usaron tres enfoques para cuantificar los resultados del ensayo. La señal integrada total de la zona de detección de la que se obtuvieron imágenes se determinó sumando la señal fluorescente de todos los píxeles. La señal integrada de la muestra se comparó con la de controles negativos. La medición de la señal integrada total es especialmente útil para muestras que contienen numerosas células diana. Un segundo enfoque era contar los objetos fluorescentes en la zona de detección. Un tercer enfoque era integrar la intensidad de todos los píxeles contenidos dentro de los objetos fluorescentes (en oposición a sumar la intensidad de todos los píxeles de la imagen). Todos los análisis de imágenes se realizaron usando Image-Pro v 4.0 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD).

Se logró la obtención de la señal integrada total definiendo inicialmente un área sobre la membrana (el área de interés). Image-Pro permite que el área de interés se convierta en un único objeto y otras herramientas de Image-Pro permiten que se sume la señal total de los píxeles representados en este objeto. Se analizó entonces de la misma forma una imagen similar a partir de una membrana sobre la que no se añadieron células diana y se usó como control negativo. Los valores del control negativo se restaron de los valores de las muestras que contenían la diana. Esta resta eliminó tanto el ruido electrónico como el del ensayo.

El segundo y tercer métodos de cuantificación usaron la utilidad de hallazgo de objetos de Image-Pro. Esta utilidad une píxeles contiguos que tienen un valor (señal) por encima de un umbral automático o definido por el usuario. Esto establece una línea de contorno alrededor del perímetro del objeto. Los píxeles del perímetro y los de dentro se

definen como el objeto, y la suma de estos valores de píxeles da como resultado el valor de integración del objeto. Entonces se usó el software de análisis para contar todos los objetos en un área de interés que representa el fondo del recipiente de la muestra y, además, puede usarse para calcular la intensidad de señal integrada de todos los objetos encontrados.

- 5 Usando el lenguaje macro de Image-Pro IPP, las utilidades anteriores pueden automatizarse para permitir el procesamiento discontinuo de varias imágenes de una vez. Además, los datos pueden manipularse con otros programas instructores de IPP definidos por el usuario. Por ejemplo, pueden incluirse o excluirse objetos por encima o por debajo de un cierto tamaño (área) o intensidad, lo que puede ser una herramienta útil para la exclusión del polvo. Otros parámetros importantes para el análisis de imágenes que determinan la definición de objetos (por ejemplo, los criterios de aceptación y rechazo) varían según la aplicación y deben optimizarse en consecuencia.

- 10 Diversos aspectos de la invención pueden automatizarse incluyendo la conexión de las etapas explicadas anteriormente de manera resumida. Considérese una aplicación para analizar muestras líquidas tales como agua farmacéutica para inyección o una muestra de orina líquida. El sistema automatizado, partiendo de la muestra en un vaso de precipitados de recogida, puede recoger las células diana sobre una membrana mediante filtración, colocarla sobre medios de crecimiento, incubar las células diana en condiciones de crecimiento, obtener imágenes de la membrana a intervalos regulares y notificar los resultados. Alternativamente, pueden automatizarse funciones individuales de la invención. Por ejemplo, pueden incorporarse en el sistema módulos para cargar y descargar automáticamente placas de Petri (o dispositivos desechables alternativos usados para hacer crecer microbios) en el instrumento de obtención de imágenes y para enfocar automáticamente.

- 15 **Ejemplos.** Los ejemplos a continuación proporcionan detalles técnicos para implementar diversas realizaciones de la invención o divulgación, respectivamente, para su uso junto con una variedad de aplicaciones que no se pretende que sean limitativos.

Ejemplo 1. Detección e identificación de microcolonias bacterianas usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas.

- 25 **Antecedentes y objetivos:** La detección del crecimiento microbiano está en la base tanto de la microbiología clínica (por ejemplo, pruebas de sensibilidad antimicrobiana e identificación bacteriana) como de la microbiología industrial (por ejemplo, pruebas de esterilidad exigidas), pero los métodos comúnmente usados son lentos. Los retrasos consecuentes en el análisis producen muertes y padecimiento de situaciones clínicas innecesarios y demandan un gran coste financiero en la industria.

- 30 El uso de obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas para detectar microcolonias individuales se aprovecha de las ventajas del cultivo microbiano mientras que evita las desventajas sustanciales de los métodos tradicionales y emergentes. Las ventajas del análisis de replicación *in situ* usando la invención son: velocidad, facilidad de multiplexación (exploración para más de un microbio); y la capacidad para detectar e identificar sin sacrificar la viabilidad de las microcolonias (esencial para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana eficaces).

- 35 **Objetivo experimental.** El ejemplo demuestra la capacidad de la invención para detectar la replicación *in situ* de microcolonias bacterianas. El principio del método se representa en la figura 7. Las bacterias se depositan sobre un filtro y se deja que se repliquen *in situ*. Las microcolonias resultantes se marcaron de dos formas: con la tinción de ácido nucleico Syber Green I y mediante la unión a anticuerpos específicos de grupo marcados con FITC. Se detectaron entonces las microcolonias marcadas usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas basada en CCD.

- 40 **Métodos experimentales.** Se hicieron crecer células *E. coli* MG1655 durante la noche en medio LB hasta una densidad de aproximadamente 10^9 células/ml. Se determinó el número aproximado de células contando diluciones del cultivo de durante la noche en un hemocitómetro. Entonces se diluyó el cultivo de durante la noche para lograr aproximadamente 10^3 células/ml. Se depositó un mililitro de la dilución sobre un filtro de policarbonato negro (Osmonics; número de catálogo K02BP04700) usando un dispositivo de filtración a vacío y una copa de embudo de plástico (guía de usuario de Millipore Microfil V, PF07114, Rev A 3/00). Se prepararon de esta manera dieciséis filtros separados con ~1000 células, cuatro filtros para cada uno de los cuatro puntos de tiempo (0, 1,5, 3 y 24 horas). Tras la filtración, se puso cada filtro sobre una placa de agar separada que contenía medio de crecimiento LB, que se precalentó hasta 37°C, y se puso en un incubador a 37°C. Periódicamente, (0, 1,5, 3, 24 horas) se sacaron cuatro filtros del incubador. Dos de estos filtros se fijaron en formaldehído al 3,0% durante 10 minutos, añadiendo el filtro con las bacterias hacia arriba sobre un punto de 500 μ l de formaldehído que se colocó sobre un trozo de Parafilm™. Tras la fijación, los filtros se pusieron sobre una almohadilla absorbente para absorber el formaldehído en exceso. A continuación, se añadió sobre el filtro una disolución 10X de Syber Green I (200 μ l, Molecular Probes). Se dejó que se tiñeran las células durante 10 minutos. Los otros dos filtros que no se usaron en la tinción de ácido nucleico se bloquearon con PBS-B durante 15 min. y entonces se añadieron a los filtros anticuerpos anti-*E. coli* marcados con FITC (Fitzgerald). Tras 30 minutos de incubación, se pusieron los filtros sobre una almohadilla absorbente para absorber cualquier líquido residual. Entonces se obtuvieron imágenes de todas las membranas poniendo el filtro sobre un instrumento de obtención de imágenes basado en CCD (descrito en la etapa 5 de la sección de descripción detallada y mostrado en la figura 3) de modo que las bacterias estaban orientadas

hacia la fuente de iluminación y el chip de CCD.

Resultados. En este ejemplo, se dejó que células individuales experimentasen varias generaciones de replicación con el fin de formar microcolonias. Se marcaron las microcolonias o bien con Syber Green I o bien con un anticuerpo marcado con FITC. En la figura 6, la fila superior de paneles muestra el punto de tiempo de hora 0 que contiene células individuales. La fila inferior de paneles muestra microcolonias tras 3 horas de incubación. Hubo un aumento sustancial en tamaño y señal de los objetos detectados mediante la obtención de imágenes de CCD a lo largo del tiempo debido al aumento en el número de células en los sitios en los que se depositaron originalmente las células formadoras de colonias. La detección del crecimiento es fundamental para la práctica microbiológica médica e industrial.

Este ejemplo muestra que la invención puede disminuir drásticamente el tiempo requerido para la detección del crecimiento microbiano.

Ejemplo 2. Detección basada en autofluorescencia de microcolonias bacterianas usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas.

Antecedentes y objetivos: La importancia de los métodos que detectan el crecimiento microbiano y las limitaciones de los métodos actuales se tratan en la sección de antecedentes. Este ejemplo muestra un método muy sencillo aunque potente basado en la presente invención que detecta rápidamente el crecimiento de microcolonias bacterianas. El método se basa en la fluorescencia intrínseca (autofluorescencia) de las células diana para generar una señal detectable. Por tanto, este método no usa moléculas de unión a una categoría o restos de señalización exógenos para lograr la obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas de células diana microscópicas. Las ventajas de la enumeración no destructiva sin reactivos incluyen la generación de cultivos purificados (para pruebas de sensibilidad a antibióticos e identificación microbiana), un método de validación mejorado y la capacidad para realizar un seguimiento del crecimiento microbiano a lo largo del tiempo (para la diferenciación de objetos y la cinética de crecimiento).

Métodos experimentales. Se hicieron crecer células *E. coli* MG1655 como en el ejemplo 1. Se diluyeron en serie células bacterianas (diluciones de diez veces) con PBS estéril. Se depositaron células bacterianas (volumen de 50 ml de la dilución 10^{-7}) sobre un filtro de polycarbonato negro (Osmonics; número de catálogo K02BP04700) usando un dispositivo de filtración a vacío y una copa de embudo de plástico (guía de usuario de Millipore Microfil V, PF07114, Rev A 3/00). Se preparó un control negativo filtrando PBS estéril. Tras la filtración, se puso cada filtro sobre una placa de agar separada que contenía medio de crecimiento LB, que se precalentó hasta 37°C, y se puso en un incubador a 37°C. Se determinó el recuento de células viables de la dilución 10^{-7} filtrando muestras por duplicado e incubando el filtro sobre agar LB. Este procedimiento indicó que la dilución 10^{-7} contenía aproximadamente 1000 células por 50 ml. A las 5,25 horas, se obtuvieron imágenes de las membranas poniendo los filtros soportados sobre portaobjetos de microscopio de vidrio en un instrumento de obtención de imágenes basado en CCD (descrito en la etapa 5 de la sección de descripción detallada y mostrado en la figura 3) de modo que las bacterias estaban orientadas hacia la fuente de iluminación y la cámara de CCD. Se usó un grupo de filtros ópticos de FITC (Chroma; excitación 470/40 nm, emisión 522/40 nm) y se capturó una exposición de un segundo usando el control de software (Image Pro Plus, versión 4.1; Media cybernetics).

Resultados. La figura 7 muestra la detección basada en autofluorescencia de microcolonias bacterianas tras 5,25 horas de crecimiento. Un filtro que contenía microcolonias proporcionó intensas señales tras una exposición de un segundo (figura 7, panel izquierdo), mientras que un filtro que carecía de microcolonias, pero que por lo demás se procesó y se obtuvieron imágenes del mismo de manera idéntica, no presentó tales señales (figura 7, panel derecho).

El ejemplo demuestra que esta realización muy sencilla de la invención es un enfoque potente para la detección del crecimiento microbiano. La técnica puede usarse para hacer que muchas aplicaciones de diagnóstico microbiano importantes sean más eficaces incluyendo pruebas de esterilidad, pruebas medioambientales y de agua, identificación microbiana y sensibilidad microbiana.

Ejemplo 3. Un método sencillo para validar una prueba de enumeración microbiana sin reactivos rápida usando una comparación interna con el método de cultivo tradicional.

Antecedentes y objetivos: Demostrar la equivalencia de una nueva prueba microbiológica con el método de referencia es una tarea esencial tanto para los desarrolladores de nuevos métodos como para sus clientes. Los requisitos de validación formalizados están codificados generalmente en reglamentos gubernamentales que guían la introducción de nuevos métodos microbiológicos en la industria y la asistencia sanitaria. Algunas veces, nuevos métodos para pruebas microbiológicas en la industria farmacéutica han fallado debido a la dificultad de demostrar la equivalencia con los métodos aceptados. El objetivo de este ejemplo es mostrar un método sencillo para demostrar la equivalencia de una prueba basada en la invención con la prueba de cultivo microbiano tradicional.

Métodos experimentales. Se hicieron crecer células *E. coli* MG1655 y se analizaron como en el ejemplo 2. Tras obtener imágenes de las microcolonias, volvió a incubarse el filtro a 37°C durante aproximadamente 15 horas. Se obtuvieron imágenes de las macrocolonias resultantes usando luz blanca reflejada suministrada por una lámpara

incandescente de microscopio que iluminaba de manera oblicua a la placa. Por lo demás, se usó el mismo sistema de obtención de imágenes para recoger la luz reflejada que se usó para detectar la autofluorescencia de las microcolonias.

5 **Resultados.** Que esta realización de la invención no daña a los microbios es evidente comparando los paneles izquierdo y derecho de la figura 8. La correspondencia exacta entre las microcolonias “ancestrales” (panel izquierdo) y sus macrocolonias “descendientes” (el panel derecho) mediante esta comparación interna debe facilitar la demostración de la equivalencia con la prueba de enumeración mediante cultivo microbiano tradicional.

Ejemplo 4. Exactitud y límite de detección de la detección de microcolonias autofluorescentes usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

10 **Antecedentes y objetivos:** La detección exacta de pequeños números de microbios es crítica tanto en la microbiología industrial como en la asistencia sanitaria. Por ejemplo, puede estar presente sólo una célula bacteriana en una muestra de sangre de 10 ml en un paciente con una infección sanguínea potencialmente mortal. De manera similar, las pruebas de esterilidad de un fármaco inyectable en la fabricación farmacéutica deben detectar una única célula microbiana viva en una muestra. En ambos casos, los resultados falsos negativos y los resultados falsos positivos pueden tener consecuencias graves. La fracción de resultados de la prueba que son falsos positivos y falsos negativos define la exactitud de un método de prueba.

El objetivo de este ejemplo es mostrar la exactitud de la invención al nivel más bajo de las células diana.

20 **Métodos experimentales.** Se hicieron crecer células *E. coli* MG1655 y se analizaron como en el ejemplo 3. Sin embargo, para este ejemplo se aplicó una dilución de células a múltiples filtros ($n = 101$) de modo que se esperaba que en promedio la zona de detección en aproximadamente uno de cinco filtros contuviese una única célula diana. Tras 5 h de incubación, se obtuvieron imágenes de cada filtro y se puntuaron para la presencia de microcolonias. Entonces volvieron a incubarse los filtros durante la noche y se puntuaron para la presencia de macrocolonias. Entonces se compararon los resultados obtenidos usando la invención se con los resultados obtenidos usando el método visual tradicional.

25 **Resultados.** La figura 9 muestra el método usado en este ejemplo para medir la exactitud de la invención cuando las muestras contienen los niveles extremadamente bajos de células diana. Para cada uno de los 101 filtros, el resultado obtenido puntuando las microcolonias fue el mismo que el resultado obtenido mediante el método tradicional. Tal como se evalúa mediante la presencia de o bien microcolonias o bien macrocolonias, la mayoría de los filtros ($n = 80$) no tenían células diana depositadas. Además, en los filtros que contenían células diana depositadas ($n = 21$), las microcolonias se produjeron en los mismos números (varios filtros tenían múltiples células diana, tal como se esperaría estadísticamente) y con la colocación idéntica sobre los filtros que las macrocolonias, añadiendo robustez adicional a los resultados. La invención y el método de referencia concordaban en un 100%, sin falsos positivos o falsos negativos detectados. Por tanto, los resultados indican que la invención es exacta a niveles de células diana muy bajos.

35 **Ejemplo 5.** Determinación del número de células microbianas en microcolonias bacterianas autofluorescentes detectadas rápidamente usando obtención de imágenes no aumentadas sin reactivos.

40 **Antecedentes y objetivos:** El objetivo de este ejemplo es demostrar la sensibilidad y la velocidad de la detección sin reactivos de la autofluorescencia de las microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas. La detección rápida del crecimiento microbiano es el resultado de la capacidad de la invención para detectar microcolonias en estadios tempranos cuando el número de células es pequeño. Los experimentos en el ejemplo determinan el número de células bacterianas en microcolonias detectadas mediante obtención de imágenes de CCD no aumentadas.

45 **Métodos experimentales:** Se inoculó una única colonia de *Escherichia coli* (ATCC, número de catálogo 8739) hecha crecer recientemente en un tubo cónico (50 ml) que contenía medio de crecimiento (TSB; 10 ml) y se incubó (16 horas, 37°C, 150 rpm). Se usó este cultivo que contenía células en fase estacionaria ($2,4 \times 10^9$ /ml) para inocular un matraz Erlenmeyer (500 ml) que contenía TSB precalentado (37°C, 100 ml) para producir un cultivo en fase logarítmica durante un tiempo óptimo hasta la detección. Este matraz, que contenía TSB precalentado, se inoculó con el cultivo en fase estacionaria (100 μ l) y se incubó 2 horas, 37°C, 150 rpm. Se encontró que un cultivo establecido de esta forma contenía $\sim 5 \times 10^7$ bacterias/ml mediante titulación por vertido en placa. Se diluyó el cultivo en fase logarítmica en PBS (10^6). Se filtró un volumen (10 ml) de esta dilución a través de una membrana (Chemunex Inc., Chemfilter CB0.4, negra, PET-23, 25 mm) soportada sobre una almohadilla absorbente (Whatman Inc., número de catálogo 1441325) usando un dispositivo de filtración (Millipore Inc., 1225 Sampling Manifold, número de catálogo XX27 025 50). Tras recoger las bacterias sobre la membrana, se puso la membrana sobre una placa de TSA precalentada (32,5°C). Se capturó una imagen de la placa (exposición de 30 s) usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas con un grupo de filtros ópticos de FITC (Chroma; excitación 470/40 nm, emisión 522/40 nm) usando control de software (Image Pro Plus, Media Cybernetics). Tras esta captura de imagen inicial, se puso la placa en un incubador (32,5°C) para el crecimiento. Se retiró la placa del incubador tras 2,5 horas de crecimiento y se tomaron imágenes del mismo campo de nuevo usando los ajustes de captura de imágenes

aplicados anteriormente. Tras capturar las imágenes, se fijó inmediatamente la membrana (formaldehído al 1,5% en agua filtrada de tipo 1 durante 5 minutos) seguido por dos lavados (PBS, 5 min. cada uno) poniendo la membrana sobre papel Whatman 3M impregnado con disoluciones o bien de fijación o bien de lavado tal como se indica. Se puso la membrana sobre el colector de muestreo bloqueando todas menos una de las ubicaciones con un tapón. Se aplicó filtración a vacío durante 15 segundos. Para teñir la membrana con el fin de enumerar las bacterias en una microcolonia individual, se añadió yoduro de propidio (1 ml, 5 µg/ml) a la pared de la copa mientras que se aplicaba presión de vacío, seguido por agua de tipo 1 (1 ml). Se aplicó presión de vacío durante otros 15 segundos tras lo cual se retiró la membrana y se puso sobre un portaobjetos de vidrio, se secó y se montó con un cubreobjetos usando el reactivo antidesvanecimiento Pro Long (Molecular Probes, Eugene, OR, número de catálogo P-4781). Se obtuvieron imágenes de las microcolonias teñidas usando microscopía de fluorescencia (microscopio de fluorescencia Axioplan II, Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY; grupo de filtros Cy3.5, número de id. de Chroma SP-103, excitación 581/10 nm, emisión 617/40 nm, 400x) equipada con la cámara SPOT RT (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, modelo número 2.3.1, 2 segundos, seleccionados sólo espectros rojos) tras el registro espacial de éstas con sus microcolonias no teñidas correspondientes identificadas usando obtención de imágenes de grandes áreas.

Resultados: La figura 10 muestra los resultados obtenidos en este ejemplo. Se tiñeron tres microcolonias detectadas tras 2,5 h de crecimiento a 32,5°C usando la invención y se analizaron usando microscopía de alta potencia. Las tres microcolonias contenían 45, 48 y 50 células, respectivamente. No se observaron células bacterianas individuales cerca de las microcolonias, demostrando que las microcolonias permanecían intactas durante todo el procedimiento de tinción. Obsérvese que las colonias visibles de *E. coli* (~1 mm de diámetro) contienen aproximadamente un millón de veces este número de células. Por tanto, usando detección sin reactivos no aumentada, la invención puede detectar microcolonias tras sólo unas pocas generaciones de división celular.

Ejemplo 6. Detección e identificación mediante obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas, basada en CCD de microcolonias bacterianas en una muestra de agua medioambiental

Antecedentes y objetivos: Este ejemplo pretende mostrar el poder de la invención para la detección rápida del crecimiento microbiano cuando se aplica a una variedad de microbios medioambientales anónimos que es probable que experimenten estrés nutricional.

El agua es un componente común en la producción, el procesamiento y la formulación de muchos productos farmacéuticos. La detección de bacterias en el agua farmacéutica es una etapa fundamental en el proceso de fabricación porque las propias bacterias o sus productos metabólicos podrían producir consecuencias adversas si están presentes en el producto final. La proliferación de bacterias puede producirse en la producción, el almacenamiento y la distribución de esta sustancia. El agua potable es el agua de alimentación fuente para el agua farmacéutica y es la fuente exógena principal de contaminación microbiana. Los coliformes fecales y una amplia variedad de microorganismos, en buena parte bacterias Gram negativas, pueden estar presentes en el agua potable. Los métodos usados comúnmente para detectar bacterias en el agua son lentos y, por tanto, dificultan el control del sistema oportuno.

El uso de la obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas para detectar microcolonias bacterianas individuales se aprovecha de las ventajas del análisis de replicación *in vitro* mientras que evita las desventajas sustanciales de los métodos tradicionales y emergentes. Las ventajas del análisis de replicación *in situ* usando la invención son: velocidad y la capacidad para detectar e identificar sin sacrificar la viabilidad de las microcolonias (útil para identificar la fuente de contaminación microbiana en un producto o un proceso o para determinar si un microorganismo particular es perjudicial para los productos o los procesos en los que se usa el agua.)

Visión general experimental. El ejemplo demuestra la capacidad de la invención para detectar la replicación *in situ* de microcolonias bacterianas antes de que estas colonias crezcan para dar macrocolonias. Las bacterias se depositan sobre un filtro y se deja que se repliquen *in situ*. Las microcolonias y macrocolonias resultantes de detectaron usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas, basada en CCD usando autofluorescencia (filtros de emisión y excitación de FITC) y reflectancia de luz blanca.

Métodos experimentales. Se recogió agua de manera aséptica del río Charles (Cambridge, MA) y se usó en el experimento en el plazo de una hora desde la recogida. Se centrifugó el agua del río Charles a un parámetro de 14.000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415C durante 1-2 segundos. El agua del río Charles centrifugada se diluyó 1:10 con agua estéril tipo I y se depositaron 1,0 ml de ésta sobre un filtro negro de éster mixto de celulosa (Millipore; número de catálogo HABP04700) usando un dispositivo de filtración a vacío y un embudo de plástico estéril (embudo de 100 ml de Microfil® de Millipore, número de catálogo MIHABG072). Cada filtro se colocó tras la filtración sobre una placa de agar separada que contenía medio de crecimiento R2A (Becton Dickinson/Difco; número de catálogo 218263). Se prepararon diez filtros separados y se incubaron las placas de agar a 32,5°C durante hasta 74 horas. Periódicamente (tras 17, 24, 42, 50, 68 y 74 horas) se retiraron las placas de agar del incubador y se obtuvieron imágenes de los filtros colocando las placas sobre un dispositivo de obtención de imágenes basado en CCD de modo que las colonias bacterianas estuvieran orientadas hacia la fuente de iluminación y el chip de CCD. La fuente de iluminación para la reflectancia se proporcionó mediante un dispositivo de iluminación halógeno de cuarzo de 30 vatios enfriado por convección Fiber-Lite® Modelo 190 (Dolan-Jenner Industries, Inc., Lawrence, MA), y la iluminación se dirigió en un ángulo oblicuo sobre el filtro. A simple vista pueden

verse colonias bacterianas que tienen un diámetro de 0,5 mm o superior, por lo que se usó este criterio de tamaño como una característica de discriminación de una colonia bacteriana. Las colonias que tenían un diámetro de 0,55 mm o superior se identificaron y se contaron en las imágenes de reflectancia. También se determinó cuándo podían detectarse microcolonias autofluorescentes que daban lugar a una macrocolonia. Se analizaron las imágenes autofluorescentes para determinar cuándo aparecían los progenitores de las macrocolonias de 74 h. Se representó gráficamente en diversos puntos de tiempo el porcentaje de macrocolonias de 74 h que podían detectarse como microcolonias autofluorescentes.

Resultados. En este ejemplo se dejó que se replicaran las células bacterianas de una muestra de agua con el fin de formar microcolonias y macrocolonias. Se detectaron ambos tipos de colonias mediante el uso de la invención y se identificaron mediante autofluorescencia y reflectancia. Los datos mostrados en la figura 11 indican que el número de colonias que pueden observarse visualmente aumentó desde el 11% (6 colonias) a las 17 h hasta el 100% (53 colonias) a las 74 h. El noventa y cuatro por ciento (50 colonias) de las macrocolonias detectadas a las 74 horas se detectaron como microcolonias autofluorescentes a las 24 horas. Este ejemplo muestra que la invención puede disminuir drásticamente el tiempo requerido para la detección del crecimiento bacteriano y, por tanto, disminuir la cantidad de tiempo necesaria para realizar una prueba bacteriana para el agua.

Ejemplo 7. Correlación entre detección mediante obtención de imágenes de grandes áreas, no aumentadas, basada en CCD de microcolonias bacterianas y un método tradicional para enumerar bacterias

Antecedentes y objetivos: El objetivo de este ejemplo es determinar la correlación numérica de los resultados obtenidos usando la presente invención para detectar microcolonias rápidamente y los obtenidos usando un cultivo microbiano tradicional más lento.

Objetivo experimental: El ejemplo compara la enumeración de las microcolonias mediante la invención y el método de cultivo clásico de "vertido en placa". Se depositaron las bacterias sobre un filtro y se dejó que se replicaran *in situ*. Se detectaron las microcolonias resultantes usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas, basada en CCD usando autofluorescencia (filtros de emisión y excitación de FITC). Entonces se comparó el número de microcolonias obtenidas con la invención con el número de macrocolonias que se obtuvieron con el método de vertido en placa.

Métodos experimentales: Se hicieron crecer células *E. coli* 8739 durante la noche en TSB hasta una densidad de aproximadamente 10^9 células/ml. Se realizaron diluciones en serie de diez veces comenzando con aproximadamente 10^7 células/ml y terminando con aproximadamente 10^2 células/ml del cultivo de durante la noche en PBS. Se diluyó adicionalmente una alícuota de cada dilución en serie con PBS de manera que 1,0 ml contendrían aproximadamente 50 bacterias. Se puso un mililitro en una placa de Petri junto con 35 ml de agar de tripticasa y soja (TSA) (47°C) fundido (Becton Dickinson/Difco; número de catálogo 236950). Se dejaron enfriar las placas de agar a temperatura ambiente y entonces se incubaron las placas durante la noche a 32,5°C. Se prepararon diez placas de agar para cada dilución en serie. Se contaron las macrocolonias en las placas de agar mediante la inspección visual de las placas. Se depositaron diluciones de bacterias (11,3 ml) sobre un filtro negro de éster mixto de celulosa (Millipore; número de catálogo HABPO4700) usando un dispositivo de filtración a vacío y un embudo de plástico estéril (embudo de 100 ml Microfil® de Millipore, número de catálogo MIHABG072). Se colocó cada filtro sobre una placa de agar separada que contenía TSA. Se prepararon diez filtros separados para cada dilución en serie y se incubaron las placas de agar a 32,5°C durante 7 horas. Entonces se retiraron las placas del incubador y se obtuvieron imágenes de los filtros colocando las placas sobre un dispositivo de obtención de imágenes basado en CCD de modo que las colonias bacterianas estuvieran orientadas hacia la fuente de iluminación y el chip de CCD. Se detectó la autofluorescencia de cada microcolonia usando filtros de emisión y excitación de FITC. Se usó once veces más volumen con el filtro porque cada imagen constituye aproximadamente 1/11^o de toda la superficie del filtro. Por tanto, cada imagen debe contener aproximadamente el mismo número de bacterias que se puso en cada vertido en placa. Se determinó el número de microcolonias en cada imagen mediante la inspección visual de la imagen. Se calculó el número de bacterias en cada dilución en serie multiplicando el número de microcolonias o macrocolonias por un factor de dilución.

Resultados: En este ejemplo se dejó que se replicaran las células bacterianas y que formaran microcolonias sobre un filtro o macrocolonias en placas de agar. Se detectaron las microcolonias usando la invención y se detectaron las macrocolonias usando un método de cultivo clásico e inspeccionando visualmente las placas de agar. Se representó gráficamente la concentración de bacterias tal como se determinó mediante cada uno de los métodos para cada dilución en serie y los resultados se muestran en la figura 12. Cada punto representa el promedio de diez determinaciones separadas. Se obtuvo una correlación positiva entre los resultados obtenidos con la invención y los resultados obtenidos con el método clásico de vertido en placa. El coeficiente de correlación de 0,9996 indica una fuerte relación lineal entre el recuento de microcolonias con la invención y macrocolonias con un método de cultivo clásico.

Ejemplo 8. Linealidad e intervalo dinámico de una prueba de enumeración sin reactivos

Antecedentes y objetivos: Dos de los criterios de validación para un nuevo método de pruebas microbiológicas son la linealidad y el intervalo del nuevo método. El intervalo dinámico es el espacio entre los niveles superior e inferior

de microorganismos que se ha demostrado que se determinan con precisión, exactitud y linealidad usando el nuevo método de pruebas. La linealidad de un método de prueba microbiológico es su capacidad para obtener resultados que son proporcionales a la concentración de microorganismos presentes en la muestra dentro de un intervalo dado.

5 El ejemplo demuestra la linealidad de la invención a lo largo de un intervalo de niveles bacterianos. La invención detecta la presencia de microcolonias en la superficie de un filtro y cuantifica la señal autofluorescente de las microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas, basada en CCD.

Métodos experimentales. Se hicieron crecer células *E. coli* 8739 durante la noche en TSB hasta una densidad de aproximadamente 10^9 células/ml. Se realizaron diluciones en serie de diez veces comenzando con una dilución de 10^{-4} del cultivo de durante la noche y terminando con una dilución de 10^{-9} en PBS. Se depositaron cinco ml de cada dilución en serie sobre un filtro negro de éster mixto de celulosa (Pall Gelman Laboratory; número de catálogo 66585) usando un dispositivo de filtración a vacío y un embudo de plástico estéril (embudo de 100 ml Microfil® de Millipore, número de catálogo MIHABG072). Se colocó cada filtro tras la filtración sobre una placa de agar separada que contenía agar de tripticasa y soja con lecitina y Polisorbato 80 (Becton Dickinson BBL, número de catálogo 211764). Se preparó un filtro para cada dilución en serie y entonces se incubaron las placas a 32,5°C durante 6,5 horas seguido por incubación durante la noche a 32,5°C. En el punto de tiempo de 6,5 horas, se retiraron las placas de agar del incubador y se obtuvieron imágenes de los filtros colocando las placas sobre un dispositivo de obtención de imágenes basado en CCD de modo que las colonias bacterianas estuvieran orientadas hacia la fuente de iluminación y el chip de CCD. Se detectó la autofluorescencia de cada microcolonia usando filtros de emisión de GFP-LP y de excitación de GFP. Se cuantificó la señal autofluorescente de las microcolonias en cada imagen usando el software ImagePro (Media Cybernetics, Inc., versión 4.5.0.19). Tras la incubación durante la noche, se inspeccionaron visualmente las placas de agar y se contó el número de macrocolonias presentes en los filtros preparados con las diluciones de 10^{-8} y 10^{-9} . Se usó el número de macrocolonias en estos dos filtros para calcular el número de bacterias añadidas a cada membrana y la concentración de bacterias en el cultivo inicial nocturno.

Resultados. En este ejemplo se dejó que se replicaran las células bacterianas y que formaran microcolonias sobre un filtro en placas de agar. Se detectaron las microcolonias mediante el uso de la invención y se identificaron mediante autofluorescencia de GFP-LP. Se cuantificó la señal autofluorescente de las microcolonias en cada imagen usando el software ImagePro. Se representó gráficamente la señal autofluorescente en cada imagen frente al número de bacterias añadidas a cada filtro y los resultados se muestran en la figura 13. Los datos son lineales a lo largo de un intervalo de 5 log de niveles bacterianos. Este intervalo es significativo porque el intervalo de algunos métodos de cultivo clásicos, es decir, de vertido en placas es de sólo 2 log. Los resultados también muestran una linealidad muy fuerte con un valor de R^2 de 0,9929. Este valor está dentro de los valores aceptables de R^2 (d 0,8 a 1,2) para un nuevo método de pruebas microbiológico (Evaluation, Validation, and Implementation of New Microbiological Testing Methods. 2000; PDA Journal de Pharmaceutical Science & Technology 54 (Suplemento TR33), 1-41).

35 **Ejemplo 9.** Pruebas de eficacia del conservante antimicrobiano rápidas sin diluciones de la muestra

Antecedentes y objetivos: Se añaden conservantes antimicrobianos a artículos envasados en envases de múltiples dosis para protegerlos contra el crecimiento de microorganismos que pueden introducirse por el proceso de fabricación o por los clientes durante la retirada de las dosis individuales. Debe demostrarse la eficacia antimicrobiana para productos farmacéuticos que contienen actividad antimicrobiana intrínseca o para productos que contienen un conservante antimicrobiano. Las pruebas son muy laboriosas y caras de realizar debido al gran número de diluciones de la muestra que deben analizarse. Normalmente, una prueba de eficacia de conservante antimicrobiano requiere el análisis de *cientos* de placas de cultivo microbiano. Un objetivo importante de este ejemplo es demostrar el potencial de la invención para eliminar la mayor parte del trabajo de la prueba obviando la necesidad de diluciones de la muestra.

Métodos experimentales. Se hicieron crecer durante la noche células *E. coli* 8739 en TSB hasta una densidad de aproximadamente 10^9 células/ml. Se añadieron las bacterias ($8,48 \times 10^6$ totales o $2,12 \times 10^5$ células/ml) a 40 ml de PBS estéril o a 40 ml de solución salina conservada estéril marca Osco (distribuida por American Procurement and Logistics Company, número de lote 1T016, fecha de caducidad junio de 03). Se incubaron estas dos disoluciones a temperatura ambiente durante 168 horas. Tras 0, 24, 96 y 168 horas, se extrajeron 5 ml de PBS que contenía las bacterias y 5 ml de la solución salina Osco que contenía las bacterias y se añadieron a tubos separados que contenían 45 ml de caldo de neutralización D/E estéril (Becton Dickinson/Difco, número de catálogo 281910). Entonces se depositó la muestra diluida sobre un filtro negro de éster mixto de celulosa (Pall Gelman Laboratory; número de catálogo 66585) usando un dispositivo de filtración a vacío y un embudo de plástico estéril (embudo de 100 ml Microfil®, de Millipore número de catálogo MIHABG072). Se colocó cada filtro sobre una placa de agar separada que contenía agar de tripticasa y soja con lecitina y Polisorbato 80 (Becton Dickinson BBL, número de catálogo 211764). Se preparó un filtro para cada disolución en cada punto de tiempo. Se incubaron las placas de agar a 32,5°C durante 6,5 horas. Se retiraron las placas de agar del incubador y se obtuvieron imágenes de los filtros colocando las placas sobre un dispositivo de obtención de imágenes basado en CCD de modo que las colonias bacterianas estuvieran orientadas hacia la fuente de iluminación y el chip de CCD. Se detectó la autofluorescencia usando filtros de emisión de GFP-LP y de excitación de GFP. Se cuantificó la señal autofluorescente de las microcolonias en cada imagen usando el software ImagePro (Media Cybernetics, Inc.,

versión 4.5.0.19). Usando la curva patrón mostrada en el ejemplo 8, se convirtió la señal autofluorescente obtenida mediante el análisis de ImagePro en el número de bacterias añadido por membrana y luego en la concentración de bacterias por ml de disolución (PBS o solución salina Osco) para cada punto de tiempo. Dada la concentración de partida de las bacterias tras 0 horas de incubación, se calculó la disminución logarítmica en la concentración bacteriana para los puntos de tiempo de 24, 96 y 168 horas. Tras 0, 24, 96 y 168 horas, se extrajeron 100 µl de las disoluciones de PBS y solución salina Osco que contenían las bacterias y se añadieron a 900 µl de caldo de neutralización D/E (dilución 1:10). Entonces se realizaron diluciones en serie de 10 veces en 1,0 ml de PBS estéril de la dilución 1:10 comenzando en 10^{-1} y terminando en 10^{-6} . Se añadió todo el volumen de las diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} a 30 ml de agar de tripticasa y soja fundido (45°C) con lecitina y Polisorbato 80. Se dejaron enfriar las placas de agar a temperatura ambiente y luego se incubaron las placas durante la noche a 32,5°C. Se contaron visualmente las colonias bacterianas en las placas de las dos diluciones más bajas que contenían menos de 300 colonias por placa. Se usaron estos números (multiplicados por el factor de dilución apropiado) para calcular la concentración de bacterias en las disoluciones de PBS y solución salina Osco. Dada la concentración de bacterias de partida tras 0 horas de incubación, se calculó la disminución logarítmica en la concentración bacteriana para los puntos de tiempo de 24, 96 y 168 horas. Se representó gráficamente la disminución logarítmica en la concentración bacteriana tal como se determinó mediante la invención frente a la disminución logarítmica en la concentración bacteriana tal como se determinó mediante el método de vertido en placa (un método clásico, basado en el crecimiento, de enumeración microbiológica). Los resultados se muestran gráficamente en la figura 14.

Resultados. Los resultados en la figura 14 muestran que el conservante antimicrobiano en la solución salina Osco (ácido sórbico al 0,1%) es eficaz para disminuir la concentración de bacterias. No se observó disminución en la concentración bacteriana en el PBS. Los datos indican una correlación lineal ($R^2 = 0,9633$) entre los dos métodos de enumeración aún cuando la invención no requería diluciones. Los resultados muestran el potencial de la invención para ahorrar la mayor parte del trabajo y los materiales mediante la eliminación de las onerosas diluciones de la muestra del método tradicional.

Ejemplo 10. Detección basada en autofluorescencia de un indicador biológico con estrés térmico usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

Antecedentes y objetivos: Los objetivos de este ejemplo son mostrar la aplicación potencial de la invención para aplicaciones que usan esporas termorresistentes como indicadores biológicos. Una aplicación importante son los métodos de cuantificación con esterilizador para asegurar la eficacia de los procedimientos de esterilización en la fabricación de dispositivos médicos y farmacéuticos y en laboratorios clínicos.

Un objetivo adicional es mostrar el potencial de la invención para simplificar la enumeración del indicador biológico reduciendo el número de muestras requeridas. En el método tradicional de vertido en placa, son necesarias diluciones en serie de diez veces que cubren todo el intervalo posible para cuantificar las muestras de manera precisa. En este ejemplo, se usa la obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas de la autofluorescencia del indicador biológico *Geobacillus stearothermophilus* para cuantificar la concentración de esporas viables. La cuantificación es lineal durante aproximadamente 3 órdenes de magnitud, disminuyendo el número de diluciones necesarias para determinar con precisión el número de esporas viables que quedan tras el estrés térmico. Se toma una imagen autofluorescente tras un corto periodo de crecimiento, que luego se analiza para dar una estimación de la concentración inicial de esporas viables de *G. stearothermophilus* con estrés térmico.

Métodos experimentales: Se diluyeron esporas de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 (Raven Biological Laboratories, Inc.) hasta una concentración de $\sim 2 \times 10^5$ esporas/ml en agua estéril y se sometieron a una variedad de condiciones de estrés térmico que oscilaban desde 5 minutos a 110°C hasta 15 minutos a 121°C. Las esporas tratadas con calor y un control no tratado se diluyeron en serie 10 veces en agua hasta una dilución 1/1000. Para la comparación, se analizó cada muestra mediante el método tradicional de vertido en placa además de la obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas de autofluorescencia. Se prepararon vertidos en placa poniendo 1 ml de cada dilución (incluyendo la disolución de reserva no diluida) de cada muestra en una placa de Petri seguido por la adición de 20 ml de agar de tripticasa y soja fundido (TSA, número de catálogo de BD 236950). Tras la solidificación, se incubaron las placas a 55°C durante 48 horas y se contaron manualmente. Se usaron las placas que tenían entre 30 y 300 colonias para calcular el título de esporas, a menos que ninguna placa tuviera más de 30 colonias, en cuyo caso se usó la placa que contenía 1 ml de disolución de reserva no diluida.

Para preparar las microcolonias para la obtención de imágenes de grandes áreas, se mezclaron 1 ml de la disolución de reserva no diluida y 1 ml de la dilución 1/100 con 15 ml de agua estéril y se filtraron a través de un filtro negro de HAP (número de catálogo de Millipore HAP04700) usando filtración a vacío y una copa embudo de plástico (guía de usuario de Millipore Microfil V, PF07114, Rev A 3/00). Tras la filtración, se colocó cada filtro sobre una placa de TSA separada. Se tomaron imágenes a $t=0$ horas usando el dispositivo de obtención de imágenes no aumentadas basado en CCD (descrito en la etapa 5 de la sección de Descripción detallada y mostrado en la figura 3). Se capturó la autofluorescencia usando el grupo de filtros ópticos de FITC (Chroma; excitación 470/40 nm, emisión 522/40 nm) con exposiciones de 5 segundos. Se incubaron las placas a 55°C y se tomaron imágenes a las 8 y las 20 horas. Se analizaron las imágenes usando el software Image Pro Plus (versión 4,1; Media cybernetics). Se usaron las exposiciones a $t=0$ para encontrar polvo y otros contaminantes fluorescentes que podría haber habido en las placas antes del crecimiento. Para cada imagen, se comparó la suma de las intensidades de píxeles de todos los

objetos (en el que los objetos se definen en este ejemplo particular como que contienen intensidades de píxel de desde 3200 hasta 65301 unidades de intensidad) menos la señal de los contaminantes a $t=0$ con una curva patrón generada usando esporas sin estrés, y se calculó el título de esporas a partir de la curva patrón. Se usó el valor de o bien la muestra no diluida o bien la dilución 1/100 según el cual uno caía dentro del intervalo lineal de la curva patrón. Se compararon los valores calculados de esporas/ml de la autofluorescencia a partir de la obtención de imágenes no aumentadas con los valores calculados a partir del método del vertido en placa.

Resultados: En la figura 15 puede observarse una representación gráfica del título de esporas con estrés térmico calculado a partir de vertidos en placa frente al título de esporas usando obtención de imágenes de grandes áreas autofluorescentes. Existe una buena correlación entre los valores de ambos métodos, pero eran necesarios cuatro vertidos en placa para cada dos imágenes autofluorescentes. Además, el vertido en placas tarda 48-72 horas en leerse, mientras que las imágenes autofluorescentes pueden tomarse y analizarse a las 8-20 horas de crecimiento.

Variaciones. La obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas de autofluorescencia también podría usarse para cuantificar las concentraciones de células viables de otros microorganismos indicadores biológicos, tales como *Bacillus subtilis* y *Clostridium sporogenes*.

Puede usarse una variedad de análisis de imágenes autofluorescentes para cuantificar concentraciones de células. Por ejemplo, pueden usarse recuentos de microcolonias objeto en lugar de la suma de intensidades de píxeles de los objetos. Dado que los objetos (microcolonias) son mucho más pequeños que las macrocolonias de crecimiento completo (que pueden contarse a simple vista), pueden ajustarse más dentro de la misma área sin sacrificar la precisión que puede perderse debido a un solapamiento de objetos. Además, pueden aplicarse algoritmos de hallazgo de objetos más sofisticados a las imágenes para tratar el fondo fluorescente local, los objetos en contacto y la presencia de partículas fluorescentes contaminantes.

Ejemplo 11. Detección basada en autofluorescencia de microcolonias bacterianas en carne picada

Antecedentes y objetivos: Este ejemplo ilustra la capacidad de la invención para reducir el tiempo para la detección de microcolonias bacterianas en carne picada en comparación con los métodos compendiados. La determinación del recuento de bacterias viables totales en la carne cruda es esencial para prevenir el deterioro temprano de los alimentos. Los métodos actuales tardan dos días, requiriendo a menudo que los productores transporten la carne antes de obtener los resultados de la prueba. Reducir el tiempo para la detección de microbios podría prevenir incidentes de enfermedades transmitidas por los alimentos, ineficacias en la fabricación y retiradas costosas.

Métodos experimentales: Se diluyó carne picada magra (25 g) en 225 ml de agua de peptona al 0,1% y se procesó en un dispositivo Stomacher para homogeneizar la muestra. Entonces se diluyó esta muestra en serie en agua de peptona al 0,1%. Se añadieron volúmenes apropiados de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} a PBS y luego se vertieron en dos tipos de membrana de filtración (Millipore HABP número de catálogo HABP04700 de $0,45 \mu\text{m}$ y Chemunex CB0.4 de $0,4 \mu\text{m}$ número de referencia 200-C20010-01) usando dispositivos de filtración a vacío. Se obtuvieron muestras por duplicado para cada dilución y tipo de filtro y se incubaron en placas de TSA a 35°C durante 48 h. Se capturaron las imágenes usando un dispositivo de obtención de imágenes basado en CCD a las 0, 6, 16, 24 y 48 h. Se usó un grupo de filtros ópticos de FITC (Chroma; excitación 470/40 nm, emisión 522/40 nm) y se capturó una imagen de 10 segundos bajo resolución de HDyn usando un control de software (Image Pro Plus). También se capturaron imágenes con reflectancia de luz blanca durante 10 segundos.

Resultados: Se recogieron datos de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} en ambos tipos de filtro de membrana. Se analizaron los datos contando las macrocolonias a las 48 horas que tenían 0,5 mm de diámetro o mayor en las imágenes de reflectancia. Entonces volvieron a rastrear estas macrocolonias ($\geq 0,5 \text{ mm}$) en los puntos de tiempo de 24, 16 y 6 h, en imágenes autofluorescentes y de reflectancia. La figura 16 muestra los tiempos de detección de las macrocolonias y microcolonias autofluorescentes. Al realizar un seguimiento del aspecto a lo largo del tiempo de las microcolonias que dieron lugar a las macrocolonias de 48 horas, se mostró que el 100% de las macrocolonias se detectaba mediante la invención hacia las 16 h. Estos resultados muestran el potencial de la invención para reducir significativamente el tiempo requerido para lograr los resultados en comparación con los métodos tradicionales.

Variaciones. La prueba de este ejemplo puede ampliarse para someter a prueba una variedad de alimentos, incluyendo otras carnes, verduras, bebidas y productos lácteos.

Ejemplo 12. Detección de bacterias en una muestra compleja con selección magnética no específica seguida por detección de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

Objetivo: Este ejemplo demuestra un método de inmunoensayo para seleccionar células bacterianas individuales, de manera no específica, de una muestra complicada seguido por detección rápida de microcolonias en crecimiento usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas. Más específicamente, este ejemplo demuestra la capacidad para seleccionar una variedad de bacterias de manera eficaz de la sangre y luego detectar el crecimiento de las bacterias usando el método directo de crecimiento. Este ejemplo muestra que perlas magnéticas recubiertas con una mezcla de agentes de unión pueden seleccionar especies divergentes de bacterias de una muestra compleja.

Métodos experimentales: La figura 17 muestra el proceso que sigue este ejemplo para detectar bacterias en una muestra compleja. En primer lugar, se añaden células bacterianas y perlas magnéticas a la muestra y se incuban. Las perlas magnéticas se unen a las células bacterianas; luego se secuestran los complejos usando fuerza magnética. Las perlas magnéticas se resuspenden (PBS), se filtran y se siembran en placa sobre medios de crecimiento. También se siembra en placa el sobrenadante de la selección magnética resultante. Tras un periodo de incubación, se obtienen imágenes del filtro a diversos puntos de tiempo usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas para detectar microcolonias.

Se obtuvo una matriz de partículas magnéticas mediante el acoplamiento de las partículas magnéticas con grupos tosilo activos (Dynal, Oslo, Noruega, número de catálogo 140.03) a varios agentes de unión específicos así como no específicos. Los agentes incluyen sulfato de polimixina B (Sigma; número de catálogo P1004), nanoproteína de polimixina B (Sigma; número de catálogo P2076), proteína neutralizante de endotoxina (Seikagaku America: versiones derivadas de manera natural y recombinantes, número de catálogo 910140-1, 910130-1 y 910120-1), proteína inhibidora de endotoxina (Bachem; número de catálogo H-1382), sustrato de endotoxina (Bachem; número de catálogo L-1195), anticuerpo anti-ácido lipoteicoico (QED; número de catálogo 15711), anticuerpo anti-endotoxina (QED; número de catálogo 15306 y 15301). Se sonicaron las partículas magnéticas recubiertas (1×10^8 por $10 \mu\text{l}$) (1 min.; parámetro 8; desmembrador sónico Fisher Scientific 550). Entonces se añadieron combinaciones de las perlas magnéticas recubiertas a tubos de sangre de 1,5 ml (1 ml, Biochemed; sangre humana, citrato de sodio como anticoagulante, número de catálogo 10762WB) con adiciones conocidas de aproximadamente 1, 10 ó 100 células de *Staphylococcus aureus* (ATCC n.º 27694). Se dejaron incubar la sangre, las bacterias y los imanes (1 hora a temperatura ambiente). Tras la incubación, se seleccionaron magnéticamente las perlas usando un dispositivo de separación magnética (Polysciences, Inc., Warrington, PA, número de catálogo 8MB4111S) para capturar y sujetar las partículas magnéticas. Entonces se decantó la sangre y se sembró en placa sobre TSA (Difco, número de catálogo 236950) como se había hecho con los inóculos iniciales de *Staphylococcus aureus* de 1, 10 y 100 células (usados como controles). Se resuspendieron las partículas magnéticas (1 ml de PBS) y se filtró el líquido resultante que contenía partículas magnéticas-complejos bacterianos sobre una membrana (Osmonics, poretics 47 mm, poro de $0,22 \mu\text{m}$, filtro negro de policarbonato, número de catálogo 1213889), y entonces se colocó la membrana sobre una placa de TSA. Tanto en el punto de tiempo cero como tras un corto periodo de incubación, se obtuvieron imágenes de los filtros usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas para detectar las microcolonias autofluorescentes. Se determinó la recuperación en porcentaje comparando el recuento de inóculos con el recuento de captura magnética y usando la fórmula: (captura magnética promedio/recuento de inóculos promedio) X 100.

Resultados: La figura 18 muestra los resultados experimentales que demuestran la detección de microcolonias tras la separación magnética. Esta figura muestra dos imágenes, tomadas tras cero y seis horas de crecimiento. La imagen a las seis horas tiene supuestas microcolonias (éstas son puntos brillantes que no se observan en la imagen a tiempo cero). Para confirmar que éstas son de hecho microcolonias microbianas en crecimiento, se dejaron incubar los filtros durante la noche y volvieron a obtenerse imágenes. Se detectaron macrocolonias en las posiciones de las supuestas microcolonias confirmando el resultado rápido. Se logró una recuperación mayor del 90 por ciento de *Staphylococcus aureus* para las muestras de 1 célula. Las muestras de 10 y 100 células tuvieron una recuperación mayor del 50 por ciento.

Variaciones (agentes de unión amplios): Podrían usarse numerosos agentes de unión ampliamente reactivos incluyendo aglutinina de germen de trigo, antígeno común anti-enterobacteriano, anti-proteína A, anti-proteína G, proteína de unión a LPS, mucina (agente de unión bacteriano), CD14 (se une tanto a LPS como a complejos bacterianos con LPS), colectinas (éstas se unen a las bacterias durante la fagocitosis o durante la cascada del complemento), subunidades del propio complemento tales como C3b y C4b, receptores endocíticos ("scavenger") humanos (receptores celulares que se unen a componentes bacterianos) y moléculas tectónicas (proteínas de unión a hidratos de carbono).

Variaciones (agentes de unión específicos): Puede usarse una variedad de tipos de moléculas de unión a una categoría, incluyendo anticuerpos, aptámeros y ligandos, para seleccionar específicamente un intervalo de tipos de células de las muestras complejas. En esta variación de ejemplo, se logra la selección de una *E. coli* O157:H7 usando un anticuerpo específico frente a *E. coli* O157:H7.

Variación del método experimental: En esta variación, se logra la detección de bacterias en una muestra compleja con selección magnética específica de analito. La selección va seguida por la detección de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas. La figura 17 muestra el método de uso para este ejemplo. Se mezcla una muestra que contiene *E. coli* O157:H7 con partículas magnéticas. Entonces la muestra se selecciona magnéticamente, se filtra y se obtienen imágenes de la misma en una serie de puntos de tiempo usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas. Se obtienen partículas magnéticas anti-*E. coli* O157:H7 mediante el acoplamiento de partículas magnéticas modificadas con tosilo (Dynal, Oslo, Noruega, número de catálogo 140.03; acoplamiento realizado según las recomendaciones del fabricante) a anticuerpos policlonales producidos contra *E. coli* O157:H7 (BioTrace purificado por afinidad; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, número de catálogo 01-95-90). Se sonicaron las partículas magnéticas anti-*E. coli* O157:H7 ($1 \times 10^8/10 \text{ ml}$) (1 min.; parámetro 8; desmembrador sónico Fisher Scientific 550). Entonces se añadieron las perlas magnéticas a la sangre (1 ml; Biochemed; sangre humana, citrato de sodio como anticoagulante, número de catálogo 10762WB) con adiciones

conocidas de *E. coli* O157:H7 (cepa DEC 3B, Dr. Tom Whittam, Pennsylvania State University). Se logran el crecimiento y la detección de microcolonias de *E. coli* O157:H7 siguiendo las mismas etapas usadas anteriormente en este ejemplo.

5 **Ejemplo 13.** Pruebas de sensibilidad antimicrobiana usando replicación *in situ* y obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

10 **Antecedentes y objetivos:** La importancia de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana para determinar la terapia apropiada se trata en la sección de antecedentes. La monitorización del crecimiento microbiano sobre un medio sólido es común y tiene ventajas algo significativas con respecto al crecimiento en un cultivo líquido. Es posible determinar de manera económica, simultánea y cuantitativa la sensibilidad de una cepa de bacterias a varios antibióticos sin el uso de instrumentación (por ejemplo, usando ensayos de difusión de disco), pero los métodos actuales requieren una colonia purificada y, por tanto, habitualmente no pueden realizarse hasta 1-2 días después de haber procesado la muestra del paciente. Tales retrasos pueden ser potencialmente mortales. Además, generalmente se requieren otros 1-2 días para detectar y analizar el resultado de una prueba de sensibilidad antimicrobiana.

15 **Objetivo.** El ejemplo demuestra el uso de la invención para determinar la sensibilidad a antibióticos de cepas bacterianas rápidamente. El principio del método se representa esquemáticamente en la figura 19. En el experimento descrito más adelante, se hicieron crecer cepas resistentes y sensibles sobre medios con y sin antibiótico y se detectaron microcolonias como en el ejemplo anterior. El enfoque ofrece el potencial de acortar significativamente las etapas de crecimiento prolongadas (purificación de colonias y crecimiento en antibiótico) que actualmente pueden retrasar la puesta en práctica de una terapia antimicrobiana apropiada.

20 **Métodos.** Se depositó una cepa de bacterias sensible (*E. coli* MG1655) y una resistente (*E. coli* MG1655/ pLafr I) sobre filtros como en el ejemplo anterior (ejemplo 1). Se colocaron filtros que contenían aproximadamente 1000 bacterias resistentes sobre placas de LB (agar LB; Difco) que o bien contenían antibiótico (tetraciclina; 64 µg/ml) o bien no contenían antibiótico. Tras la incubación a 37°C (3 h), se tiñeron y se obtuvieron imágenes de los filtros como en el (ejemplo 1).

25 **Resultados.** La figura 21 muestra los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas basada en CCD. La obtención de imágenes de CCD detectó microcolonias en la membrana que contenía bacterias resistentes pero no en la membrana que contenía bacterias sensibles (compárense las filas marcadas "cepa resistente" y "cepa sensible" en la columna más a la izquierda marcada: 3 horas + tet, CCD). Los datos de intensidad obtenidos a partir del análisis de imágenes cuantificaron esta observación (gráfico de barras). La microscopía de fluorescencia de alta potencia confirmó que la cepa resistente formaba microcolonias tras 3 horas de incubación, mientras que la cepa sensible no. (El análisis microscópico indicó que la incubación de la cepa sensible en presencia de antibiótico conduce a morfologías bacterianas aberrantes [compárense las dos imágenes microscópicas en la fila inferior marcada "cepa sensible"].).

30 Los resultados de este experimento muestran que la detección de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas es un método rápido y sensible para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

35 **Variaciones:** Algunas variaciones en la prueba de sensibilidad antimicrobiana incluyen usar diferentes restos de señal. En este ensayo podría sustituirse la tinción del ácido nucleico por colorantes de viabilidad, tales como Syto 9 y otros miembros de la familia Syto (Molecular Probes), sustratos de esterasa tales como diacetato de fluoresceína o chemchrome V6 (Chemunex), anticuerpos marcados o metabolitos que producen productos fluorescentes. También podría usarse la autofluorescencia natural de las células diana celulares para detectar las microcolonias. También podría usarse el crecimiento de microcolonias para monitorizar las limitaciones de crecimiento geométricas como con la difusión de disco de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana o los métodos de prueba E (AB biodisk NA Inc.; tiras de prueba E). El ensayo de sensibilidad antimicrobiana también puede ampliarse para incluir la identificación simultánea de diversos microbios con diferentes anticuerpos marcados de manera fluorescente.

40 **Ejemplo 14.** Pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas usando el método de difusión de disco y obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

45 **Objetivo:** Este ejemplo demuestra el uso de la invención para determinar la sensibilidad a antibióticos de cepas bacterianas rápidamente usando el método de difusión de disco. Se colocan discos que se han impregnado con una concentración conocida de un antibiótico sobre placas que contienen un gran número de células de un cultivo microbiano purificado. El antibiótico difunde desde el disco creando un gradiente radial de concentración de antibiótico centrado en el disco (es decir, cuanto más cerca del disco, mayor es la concentración de antibiótico). Las cepas altamente resistentes pueden crecer en presencia de los discos incluso cerca del borde en el que la concentración de antibiótico es la más alta. Las cepas menos resistentes crecen fuera de una zona de inhibición que rodea al disco. La anchura de la zona de inhibición está correlacionada con el nivel de resistencia al antibiótico para la cepa.

50 La zona de inhibición se mide tradicionalmente a simple vista tras un crecimiento durante la noche. Este ejemplo demuestra la capacidad para determinar la zona de inhibición en horas mediante la detección del crecimiento de

microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no ampliadas.

Métodos experimentales: Las cepas, usadas en el ejemplo y descritas en el ejemplo 13, se diluyeron hasta 10^6 UFC/ml y se sembraron en placa sobre medios TSA. Entonces se colocó un disco de difusión de tetraciclina (Hardy Diagnostics; 30 μ g de tetraciclina, número de catálogo Z9121) sobre las placas. Se dejaron incubar las placas a 37°C durante 5 horas. Se obtuvieron imágenes de las microcolonias usando autofluorescencia de microcolonias y obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas como en los ejemplos anteriores.

Resultados: La figura 21 muestra los resultados de una prueba de sensibilidad antimicrobiana rápida usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas. La obtención de imágenes basada en CCD detectó colonias resistentes autofluorescentes que crecían cerca de un disco de difusión de antibiótico tras sólo 5 horas. La zona de inhibición era comparable a la obtenida mediante inspección visual tras el crecimiento durante la noche. Los resultados de este experimento muestran que la detección de las zonas de inhibición basándose en el crecimiento de microcolonias es más rápido que el método de difusión de disco tradicional, pero puede proporcionar resultados comparables.

Variaciones: Esta técnica puede usarse con la mayoría de los discos de difusión de antibióticos y la mayoría de los microbios.

Ejemplo 15. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas usando el E-test™ y obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

Objetivo: Este ejemplo demuestra el uso de la invención para determinar rápidamente la sensibilidad a antibióticos de cepas bacterianas usando una tira de prueba de antibióticos E-test™. La tira E-test™ está impregnada con un intervalo de concentraciones de tetraciclina que permiten que el usuario use una tira para determinar la menor concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de las bacterias sometidas a prueba. Esta concentración inhibitoria mínima se basa en la visualización de zonas sin crecimiento, denominadas zona de inhibición. La zona de inhibición se mide tradicionalmente a simple vista tras un crecimiento durante la noche. Este ejemplo demuestra la capacidad para determinar la zona de inhibición en horas mediante la detección del crecimiento de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas.

Métodos experimentales: Las cepas, usadas en el ejemplo y descritas en el ejemplo 13, se diluyeron hasta 10^6 UFC/ml y se sembraron en placa sobre medios TSA. Entonces se colocó la tira E-test™ (Hardy diagnostics: 0,016-256 μ g de tetraciclina, número de catálogo 51002258) sobre las placas que se dejaron incubar a 37°C durante cinco horas. Se obtuvieron imágenes de las microcolonias que crecían en o cerca de la tira de prueba usando autofluorescencia de microcolonias y obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas como en los ejemplos anteriores. Tras la obtención de imágenes, se dejaron incubar las placas durante la noche.

Resultados:

La figura 22 muestra los resultados de una prueba E-test™ de sensibilidad antimicrobiana rápida usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas. La obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas detectó microcolonias resistentes autofluorescentes que crecían cerca de la tira de prueba de antibióticos E-test™. Pudo determinarse una zona de inhibición comparable a la observada tras el crecimiento durante la noche tras cinco horas de crecimiento. Los resultados de este experimento muestran que la detección de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas es un método rápido y sensible que reduce enormemente el tiempo hasta obtener los resultados para un E-test™.

Variaciones: Esta técnica es aplicable a las tiras E-test™ impregnadas con una variedad de antibióticos.

Otras realizaciones

Otras realizaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica de la consideración de la memoria descriptiva y práctica de la invención dada a conocer en el presente documento. Se prevé que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solo como a modo de ejemplo, estando un alcance real de la invención indicado mediante las siguientes reivindicaciones. Los ejemplos de otras realizaciones que pueden adaptarse a los métodos descritos en el presente documento se encuentran en la solicitud estadounidense n.º _____, titulada "RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF CELLS AND VIRUSES", presentada el 6 de septiembre de 2002 y la solicitud estadounidense n.º _____, titulada "RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF MOLECULES", presentada el 6 de septiembre de 2002.

Otras realizaciones están en las reivindicaciones.

Las siguientes páginas 78 a 98 contienen realizaciones específicas o divulgaciones, respectivamente:

1. Un método para detectar células diana vivas en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) proporcionar células diana vivas presentes en dicha muestra en una zona de detección que comprende un área

de detección a una densidad inferior a 100 células diana por mm^2 del área de detección, en el que dentro de dicha zona de detección dichas células están dispersadas e inmovilizadas al azar;

(b) permitir la formación de una o más microcolonias de dichas células diana mediante replicación *in situ*; y

(c) detectar dichas una o más microcolonias;

- 5 en el que la dimensión lineal más larga de dicha área de detección es mayor de 1 mm; dichas una o más microcolonias tienen una medida media inferior a 50 micras en al menos dos dimensiones ortogonales; dicha detección no supone un aumento de más de 5x; dicha detección detecta una propiedad de dichas una o más microcolonias que no depende de la adición de un resto de señalización o una molécula de unión a una categoría; y dichas células en dichas una o más microcolonias siguen siendo competentes para replicarse tras dicha detección.
- 10 2. El método de 1, en el que dichas células diana están dispersadas al azar en una zona de detección a una densidad inferior a 10 células diana por mm^2 del área de detección.
3. El método de 1, en el que dichas células diana están dispersadas al azar en una zona de detección a una densidad inferior a 1 célula diana por mm^2 del área de detección.
4. El método de 1, en el que dicha detección detecta una única microcolonia en el área de detección.
- 15 5. El método de 1, en el que dicha detección detecta microcolonias solapantes o contiguas.
6. El método de 1, en el que dicha detección no supone un aumento de más de 5x
7. El método de 1, en el que dicha detección no supone un aumento de más de 2x.
8. El método de 1, en el que dicha detección no supone un aumento de más de 1x.
9. El método de 1, en el que dicha detección no supone un aumento de más de 0,2x.
- 20 10. El método de 1, en el que el número medio de células en dichas una o más microcolonias es menos de 50.000 células.
11. El método de 10, en el que dichas una o más microcolonias comprenden menos de 10.000 células.
12. El método de 10, en el que el número medio de células en dichas una o más microcolonias es menos de 1000.
13. El método de 10, en el que el número medio de células en dichas una o más microcolonias es menos de 100.
- 25 14. El método de 10, en el que el número medio de células en dichas una o más microcolonias es menos de 10.
15. El método de 10, en el que dichas una o más microcolonias tienen una medida media de menos de 25 micras en la dimensión lineal más larga.
16. El método de 10, en el que dichas una o más microcolonias tienen una medida media de menos de 10 micras en la dimensión lineal más larga.
- 30 17. El método de 1, en el que dichas células diana son bacterias.
18. El método de 1, en el que dichas células diana son células eucariotas.
19. El método de 18, en el que dichas células diana son células de mohos o de hongos.
20. El método de 18, en el que dichas células diana son células humanas, animales o vegetales.
21. El método de 1, en el que dichas células diana son parásitos de seres humanos, animales o plantas.
- 35 22. El método de 1, en el que dicha detección detecta e identifica microcolonias de más de una categoría no solapante de célula.
23. El método de 1, en el que dicha muestra comprende fluidos o tejidos obtenidos de un organismo multicelular.
24. El método de 1, en el que dicha muestra comprende los fluidos corporales o tejidos de un animal.
25. El método de 1, en el que dicha muestra proviene de un ser humano.
- 40 26. El método de 1, en el que dicha muestra proviene de un vertebrado no humano.
27. El método de 1, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en: muestras respiratorias, urogenitales, del tracto reproductor, del sistema nervioso central, de orina, de sangre, dérmicas, de plasma, de

suero, de saliva, de tejido de heridas, de exudado de heridas, de biopsia, de heces, del tracto reproductor y de tejido sólido, y derivados de las mismas.

28. El método de 1, en el que dicha muestra es una muestra de sangre o de orina.

29. El método de 1, en el que dicha muestra proviene de una planta.

5 30. El método de 1, en el que dicha muestra se obtiene mediante muestreo de aire o agua medioambiental, o de superficies, objetos u organismos expuestos al medioambiente.

10 31. El método de 1, en el que dicha muestra se obtiene de un material seleccionado del grupo que consiste en material de partida, terminado o en proceso en la fabricación de productos farmacológicos, cosméticos, sanguíneos u otros para uso tópico o interno en seres humanos o animales; material de partida, en proceso o terminado en la fabricación de alimentos o bebidas; material de partida, en proceso o terminado en la fabricación de dispositivos médicos o de diagnóstico *in vitro*, productos químicos; superficies industriales; instrumentación; y maquinaria.

32. El método de 1, en el que dicha zona de detección se pone en contacto con un medio líquido que comprende una o más sustancias que facilitan la replicación de las células diana.

15 33. El método de 1, en el que dichas células se depositan directamente sobre un medio de crecimiento sólido o semisólido.

34. El método de 1, en el que, antes de la etapa (a), se usa un método de selección para depositar complejos de una o más de dichas células diana y un resto de selección en dicha zona de detección, en el que dicho método de selección se selecciona del grupo que consiste en selección magnética, centrifugación, sedimentación y filtración.

20 35. El método de 34, en el que, antes de la etapa (a), dichas células diana se ponen en contacto con restos de selección magnética específicos de célula diana y posteriormente se depositan complejos de una o más de dichas células diana y dicho resto de selección sobre dicha superficie de detección usando fuerza magnética.

36. El método de 35, en el que dichos restos de selección magnética específicos de célula diana comprenden partículas magnéticas que están conjugadas a moléculas de unión a una categoría.

25 37. El método de 34, en el que dichas células diana se ponen en contacto en un líquido con dichos restos de selección específicos de célula diana que tienen una densidad promedio mayor que la densidad promedio de dicho líquido y en el que se depositan posteriormente complejos de una o más de dichas células diana y dicho resto de selección sobre dicha superficie de detección usando fuerza gravitacional, centrifuga o centrípeta.

30 38. El método de 1, en el que dichas células diana se depositan en dicha zona de detección usando un método de selección seleccionado del grupo que consiste en selección magnética, centrifugación, sedimentación y filtración, en el que no se emplea un resto de selección.

39. El método de 1, en el que, antes de la etapa (a), dicha muestra se trata para licuar y/u homogeneizar dicha muestra.

40. El método de 1, en el que, antes de la etapa (a), dicha muestra se trata para eliminar sustancias u objetos distintos de dichas células diana.

35 41. El método de 1, que comprende además la etapa de determinar el efecto de una o más sustancias o tratamientos sobre uno o más atributos de dichas células diana.

42. El método de 41, en el que dicho atributo es la capacidad para experimentar replicación celular.

43. El método de 41, en el que dichas una o más sustancias están presentes en un medio usado para ayudar a la replicación de dichas células diana.

40 44. El método de 41, en el que dicho atributo es la capacidad de dichas células diana para replicarse tras un tratamiento de esterilización.

45. El método de 41, en el que dicho atributo es la capacidad de dichas células diana para replicarse en presencia de uno o más inhibidores potenciales de la replicación.

45 46. El método de 41, en el que dichas células diana son bacterias, hongos, parásitos o células cultivadas, y dichas sustancias son agentes antibacterianos, agentes, agentes antifúngicos o agentes antiparasitarios.

47. El método de 45, en el que dichos uno o más inhibidores son compuestos antimicrobianos.

48. El método de 45, en el que dichos uno o más inhibidores son compuestos antitumorales.

49. El método de 41, en el que dicho atributo es la viabilidad, el cambio en una propiedad óptica, la actividad

metabólica o enzimática o la constitución bioquímica de dichas células diana.

50. El método de 35, que comprende además las etapas de:

(d) poner en contacto dichas células diana con una o más sustancias o tratar dichas células con uno o más tratamientos; y

5 (e) determinar el efecto de dichas una o más sustancias o dichos uno o más tratamientos sobre uno o más atributos de dichas células diana.

51. El método de 1, en el que dicha zona de detección comprende un material seleccionado del grupo que consiste en vidrio, plástico, la superficie de pocillos de placas de microtitulación, membranas altamente absorbentes, tiras de plástico, las superficies de tubos capilares, las superficies de cámaras microfluídicas y las superficies o canales microfluídicos.

10 52. El método de 1, en el que la replicación de dichas células en dichas microcolonias se continúa tras dicha detección.

53. El método de 1, en el que la etapa (c) comprende al menos dos ciclos cada uno de los cuales comprende un periodo en el que se deja que se repliquen las células seguido por una etapa de detección.

15 54. El método de 1, que comprende además la etapa de repetir las etapas (a) - (c) con una o más muestras adicionales, en el que dicha repetición está automatizada.

55. El método de 54, en el que dichas muestras se cargan automáticamente en un instrumento que comprende un detector.

20 56. El método de 54, en el que dichas muestras se depositan automáticamente en una serie de zonas de detección que están físicamente asociadas y que se cargan automática y sucesivamente en un instrumento que comprende un detector.

57. El método de 1, en el que dicha detección comprende iluminar una o más microcolonias para generar una señal detectable.

25 58. El método de 57, en el que dicha detección detecta luz emitida, dispersada, reflejada o absorbida como resultado de la iluminación de dichas una o más microcolonias.

59. El método de 1, en el que dicha detección detecta fluorescencia.

60. El método de 59, en el que dicha fluorescencia es autofluorescencia emitida por dichas microcolonias.

61. El método de 57, en el que dicha iluminación emplea uno o más láseres.

62. El método de 57, en el que dicha iluminación emplea uno o más diodos emisores de luz.

30 63. El método de 57, en el que dicha iluminación emplea una fuente de luz blanca.

64. El método de 57, en el que dicha iluminación es a través de uno o más filtros ópticos que sólo dejan pasar longitudes de onda de luz seleccionadas.

65. Un método para detectar microcolonias de células diana, comprendiendo dicho método las etapas de:

35 (a) proporcionar células diana en una zona de detección, en el que dentro de dicha área de detección dichas células están dispersadas e inmovilizadas al azar;

(b) permitir la formación de una o más microcolonias de dichas células diana mediante replicación *in situ*, en el que al menos una de dichas microcolonias comprende menos de 100 células diana; y

(c) detectar una o más propiedades ópticas que se producen de manera natural de dichas una o más microcolonias usando un aumento de menos de 5 veces.

40 66. El método de 65, en el que dicha propiedad o propiedades ópticas comprende autofluorescencia.

67. El método de 65, en el que dicha propiedad o propiedades ópticas comprende radiación térmica.

68. El método de 65, en el que dicha propiedad o propiedades ópticas comprende absorbancia óptica.

69. El método de 68, en el que dicha absorbancia óptica está en la región del infrarrojo.

70. El método de 65, en el que dicha propiedad o propiedades ópticas comprende polarización de fluorescencia.

71. El método de 65, en el que dicha propiedad o propiedades ópticas comprende reflectancia óptica.
72. El método de 65, en el que dicha propiedad o propiedades ópticas comprende dispersión de la luz.
73. El método de 1, en el que dicha detección detecta una propiedad de dichas una o más microcolonias que no depende de la adición de un resto de señalización o una molécula de unión a una categoría.
- 5 74. El método de 1, que comprende además la etapa, antes o durante la etapa (c), de marcar dichas una o más microcolonias con un resto de señalización, en el que dicha detección en la etapa (c) detecta la señal generada por restos de señalización.
75. El método de 1, que comprende además la etapa, antes o durante la etapa (c), de poner en contacto dicha muestra con un resto de señalización que se asocia o bien directa o bien indirectamente con dichas células diana.
- 10 76. El método de 75, en el que dicho resto de señalización se asocia con una molécula de unión a una categoría.
77. El método de 1, que comprende además la etapa, antes o durante la etapa (c), de poner en contacto dicha muestra con una molécula de unión a una categoría bajo condiciones que permiten la formación de uno o más complejos entre dicha molécula de unión a una categoría y uno o más sitios de unión específicos de categoría sobre una o más de dichas células diana.
- 15 78. El método de 77, en el que dicha molécula de unión a una categoría comprende un anticuerpo, aptámero o ligando.
79. El método de 77, en el que dicha detección emplea filtros ópticos que pueden discriminar entre las firmas de señal de diferentes familias de moléculas de unión a una categoría marcadas.
- 20 80. El método de 77, en el que dicha molécula de unión a una categoría está marcada, o bien directa o bien indirectamente, con uno o más restos de señalización.
81. El método de 80, que comprende además la etapa, antes de la etapa (c), de eliminar cualquier molécula de unión a una categoría no unida de dichos uno o más complejos.
- 25 82. El método de 77, en el que dicha molécula de unión a una categoría es un miembro de un conjunto de moléculas de unión a una categoría, en el que dicho conjunto comprende una familia de moléculas de unión a una categoría específicas para cada categoría no solapante de células diana que van a detectarse.
83. El método de 82, en el que cada una de dichas familias de moléculas de unión a una categoría está marcada con un resto de señalización que emite una señal de una clase de señal o firma de señal distintas.
84. El método de 83, en el que en la etapa (c) dicha detección detecta dichas categorías no solapantes de células diana mediante detección de y discriminación entre las distintas firmas de señal o dichos restos de señalización.
- 30 85. El método de 76, en el que dicho resto de señalización es una partícula o está físicamente asociado con una partícula.
86. El método de 75, en el que dicho resto de señalización tiene un carácter de señalización fluorescente.
- 35 87. El método de 86, en el que dicho resto de señalización se selecciona del grupo que consiste en fluoróforos orgánicos, fósforos regulados por incremento, lantánidos, puntos cuánticos, enzimas que generan un producto fluorescente a partir de sustratos no fluorescentes y partículas teñidas de manera fluorescente.
88. El método de 86, en el que dicho resto de señalización es una tinción fluorescente para las células.
89. El método de 75, en el que dicho resto de señalización tiene un carácter de señalización cromogénico.
90. El método de 86, en el que dicho resto de señalización tiene un carácter de señalización quimioluminiscente.
91. El método de 75, en el que dicho resto de señalización tiene un carácter de señalización de dispersión de luz.
- 40 92. El método de 91, en el que dicho resto de señalización es una partícula de dispersión resonante de luz o una partícula de resonancia de plasmón.
93. El método de 75, en el que dicho resto de señalización es una tinción de viabilidad para teñir células vivas.
94. El método de 82, en el que dicho conjunto de moléculas de unión a una categoría tiene una complejidad de familia de 1.
- 45 95. El método de 82, en el que dicho conjunto de moléculas de unión a una categoría tiene una complejidad de familia que es mayor de 1.

96. El método de 95, en el que dicho conjunto tiene una complejidad de familia ≥ 5 .
97. El método de 75, en el que dicho resto de señalización comprende uno o más compuestos que no pueden detectarse hasta su asociación con dichas células diana, actuando sobre dicho resto de señalización un constituyente de dichas células diana o un estado fisiológico, físico o micromedioambiental de dichas células diana.
- 5 98. El método de 1, en el que dicha replicación y dicha detección se producen en un recipiente construido de modo que no se permite que entren células adicionales ni que salgan células de la muestra.
99. El método de 1, en el que dicha replicación y dicha detección se producen en un recipiente que tiene un código de barras o marcador equivalente para seguir la muestra automáticamente.
- 10 100. El método de 1, en el que dicha replicación y dicha detección se producen sobre una superficie con marcas de registro para facilitar la alineación de múltiples imágenes de la misma superficie.
101. El método de 1, en el que dicha detección detecta marcas de control o células control en una región especificada de la zona de detección.
102. El método de 1, en el que dicha detección emplea filtros ópticos adaptados para detectar una señal que proviene de la iluminación de dichas células diana.
- 15 103. El método de 1, en el que dicha detección emplea un detector fotoeléctrico.
104. El método de 1, en el que dicha detección emplea un detector de matriz fotoeléctrica.
105. El método de 104, en el que dicho detector fotoeléctrico comprende un detector de CCD.
106. El método de 1, en el que dicha detección no emplea un intensificador de imágenes.
107. El método de 1, en el que dicha detección emplea un detector de tubo fotomultiplicador.
- 20 108. El método de 1, en el que dicha detección emplea un detector de fotodiodos.
109. El método de 1, en el que dicha detección emplea una película fotosensible.
110. Un instrumento para detectar microcolonias de células diana, comprendiendo dicho instrumento:
- (a) un detector de matriz fotoeléctrica que tiene una resolución óptica de menos de 50 micras y valores de energía circunscrita superiores al 50% por píxel; y
- 25 (b) una fuente de iluminación,
- en el que dicho instrumento puede iluminar y obtener imágenes simultáneamente de un área de detección que tiene al menos una dimensión que es ≥ 1 cm, y en el que el instrumento no aumenta ópticamente más de 5 veces.
111. El instrumento de 110, en el que dicho instrumento no comprende un intensificador de imágenes.
112. El instrumento de 110, que comprende además un foco automático para enfocar dicha zona de detección.
- 30 113. El instrumento de 110, que comprende además un ordenador al que se transmiten los datos recogidos por dicho fotodetector para el análisis de imagen.
114. El método de 1, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (c), de cuantificar el número de microcolonias.
- 35 115. El método de 1, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (c), de determinar la categoría de dichas células diana analizando una imagen de dicha área de detección usando software de análisis de imágenes.
116. El método de 1, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (c), de determinar las ubicaciones en la zona de detección de dichas una o más microcolonias analizando una imagen de dicha área de detección usando software de análisis de imágenes.
- 40 117. El método de 116, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (c), de comparar dichas ubicaciones en la zona de detección de microcolonias individuales con ubicaciones previamente determinadas de las mismas microcolonias.
118. El método de 117, en el que dicho software de análisis de imágenes comprende algoritmos para distinguir objetos que cambian de tamaño a lo largo del tiempo de objetos que no cambian de tamaño a lo largo del tiempo.
119. El método de 114, en el que dicha determinación comprende analizar una imagen de dicha área de detección.

120. El método de 44, en el que dicho tratamiento de esterilización se selecciona del grupo que consiste en esterilización por calor, irradiación, exposición a gas tóxico y tratamiento con desinfectante.

La divulgación proporciona además los siguientes artículos:

1. Un método para detectar células diana vivas en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - 5 (a) proporcionar células diana vivas presentes en dicha muestra en una zona de detección que comprende un área de detección a una densidad inferior a 100 células diana por mm^2 del área de detección, en el que dentro de dicha zona de detección dichas células están dispersadas e inmovilizadas al azar;
 - (b) permitir la formación de una o más microcolonias de dichas células diana mediante replicación *in situ*; y
 - (c) detectar dichas una o más microcolonias;
- 10 en el que la dimensión lineal más larga de dicha zona de detección es mayor de 1 mm; dichas una o más microcolonias tienen una medida media inferior a 50 micras en al menos dos dimensiones ortogonales; dicha detección no supone un aumento de más de 5x; dicha detección detecta una propiedad de dichas una o más microcolonias que no depende de la adición de un resto de señalización o una molécula de unión a una categoría; y dichas células en dichas una o más microcolonias siguen siendo competentes para replicarse tras dicha detección.
- 15 2. El método del artículo 1, en el que dichas células diana están dispersadas al azar en una zona de detección a una densidad inferior a 10 células diana por mm^2 del área de detección.
 3. El método del artículo 1, en el que dichas células diana están dispersadas al azar en una zona de detección a una densidad inferior a 1 célula diana por mm^2 del área de detección.
 4. El método del artículo 1, en el que dicha detección detecta una única microcolonia en el área de detección.
 - 20 5. El método del artículo 1, en el que dicha detección detecta microcolonias solapantes o contiguas.
 6. El método del artículo 1, en el que dicha detección no supone un aumento de más de 2x.
 7. El método del artículo 1, en el que dicha detección no supone un aumento de más de 1x.
 8. El método del artículo 1, en el que dicha detección no supone un aumento de más de 0,2x.
 9. El método del artículo 1, en el que el número medio de células en dichas una o más microcolonias es menos de 50.000 células.
 - 25 10. El método del artículo 9, en el que dichas una o más microcolonias comprenden menos de 10.000 células.
 11. El método del artículo 9, en el que el número medio de células en dichas una o más microcolonias es menos de 1000.
 12. El método del artículo 9, en el que el número medio de células en dichas una o más microcolonias es menos de 100.
 - 30 13. El método del artículo 9, en el que el número medio de células en dichas una o más microcolonias es menos de 10.
 14. El método del artículo 9, en el que dichas una o más microcolonias tienen una medida media de menos de 25 micras en la dimensión lineal más larga.
 - 35 15. El método del artículo 9, en el que dichas una o más microcolonias tienen una medida media de menos de 10 micras en la dimensión lineal más larga.
 16. El método del artículo 1, en el que dichas células diana son bacterias.
 17. El método del artículo 1, en el que dichas células diana son células eucariotas.
 18. El método del artículo 17, en el que dichas células diana son células de mohos o de hongos.
 - 40 19. El método del artículo 17, en el que dichas células diana son células humanas, animales o vegetales.
 20. El método del artículo 1, en el que dichas células diana son parásitos de seres humanos, animales o plantas.
 21. El método del artículo 1, en el que dicha detección detecta e identifica microcolonias de más de una categoría de célula no solapante.
 22. El método del artículo 1, en el que dicha muestra comprende fluidos o tejidos obtenidos de un organismo

multicelular.

23. El método del artículo 1, en el que dicha muestra comprende los fluidos corporales o tejidos de un animal.
24. El método del artículo 1, en el que dicha muestra proviene de un ser humano.
25. El método del artículo 1, en el que dicha muestra proviene de un vertebrado no humano.
- 5 26. El método del artículo 1, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en: muestras respiratorias, urogenitales, del tracto reproductor, del sistema nervioso central, de orina, de sangre, dérmicas, de plasma, de suero, de saliva, de tejido de heridas, de exudado de heridas, de biopsia, de heces, del tracto reproductor y de tejido sólido, y derivados de las mismas.
27. El método del artículo 1, en el que dicha muestra es una muestra de sangre o de orina.
- 10 28. El método del artículo 1, en el que dicha muestra proviene de una planta.
29. El método del artículo 1, en el que dicha muestra se obtiene mediante muestreo de aire o agua medioambiental, o de superficies, objetos u organismos expuestos al medioambiente.
- 15 30. El método del artículo 1, en el que dicha muestra se obtiene de un material seleccionado del grupo que consiste en material de partida, terminado o en proceso en la fabricación de productos farmacológicos, cosméticos, sanguíneos u otros para uso tópico o interno en seres humanos o animales; material de partida, en proceso o terminado en la fabricación de alimentos o bebidas; material de partida, en proceso o terminado en la fabricación de dispositivos médicos o de diagnóstico *in vitro*, productos químicos; superficies industriales; instrumentación; y maquinaria.
- 20 31. El método del artículo 1, en el que dicha zona de detección se pone en contacto con un medio líquido que comprende una o más sustancias que facilitan la replicación de las células diana.
32. El método del artículo 1, en el que dichas células se depositan directamente sobre un medio de crecimiento sólido o semisólido.
- 25 33. El método del artículo 1, en el que, antes de la etapa (a), se usa un método de selección para depositar complejos de una o más de dichas células diana y un resto de selección en dicha zona de detección, en el que dicho método de selección se selecciona del grupo que consiste en selección magnética, centrifugación, sedimentación y filtración.
34. El método del artículo 33, en el que, antes de la etapa (a), dichas células diana se ponen en contacto con restos de selección magnética específicos de célula diana y posteriormente se depositan complejos de una o más de dichas células diana y dicho resto de selección sobre dicha superficie de detección usando fuerza magnética.
- 30 35. El método del artículo 34, en el que dichos restos de selección magnética específicos de célula diana comprenden partículas magnéticas que están conjugadas a moléculas de unión a una categoría.
36. El método del artículo 33, en el que dichas células diana se ponen en contacto en un líquido con dichos restos de selección específicos de célula diana que tienen una densidad promedio mayor que la densidad promedio de dicho líquido y en el que se depositan posteriormente complejos de una o más de dichas células diana y dicho resto de selección sobre dicha superficie de detección usando fuerza gravitacional, centrífuga o centrípeta.
- 35 37. El método del artículo 1, en el que dichas células diana se depositan en dicha zona de detección usando un método de selección seleccionado del grupo que consiste en selección magnética, centrifugación, sedimentación y filtración, en el que no se emplea un resto de selección.
- 40 38. El método del artículo 1, en el que, antes de la etapa (a), dicha muestra se trata para licuar y/u homogeneizar dicha muestra.
39. El método del artículo 1, en el que, antes de la etapa (a), dicha muestra se trata para eliminar sustancias u objetos distintos de dichas células diana.
40. El método del artículo 1, que comprende además la etapa de determinar el efecto de una o más sustancias o tratamientos sobre uno o más atributos de dichas células diana.
- 45 41. El método del artículo 40, en el que dicho atributo es la capacidad para experimentar replicación celular.
42. El método del artículo 40, en el que dichas una o más sustancias están presentes en un medio usado para ayudar a la replicación de dichas células diana.
43. El método del artículo 40, en el que dicho atributo es la capacidad de dichas células diana para replicarse tras un tratamiento de esterilización.

44. El método del artículo 40, en el que dicho atributo es la capacidad de dichas células diana para replicarse en presencia de uno o más inhibidores potenciales de la replicación.
45. El método del artículo 40, en el que dichas células diana son bacterias, hongos, parásitos o células cultivadas, y dichas sustancias son agentes antibacterianos, agentes, agentes antifúngicos o agentes antiparasitarios.
- 5 46. El método del artículo 44, en el que dichos uno o más inhibidores son compuestos antimicrobianos.
47. El método del artículo 44, en el que dichos uno o más inhibidores son compuestos antitumorales.
48. El método del artículo 40, en el que dicho atributo es la viabilidad, el cambio en una propiedad óptica, la actividad metabólica o enzimática o la constitución bioquímica de dichas células diana.
49. El método del artículo 34, que comprende además las etapas de:
- 10 (d) poner en contacto dichas células diana con una o más sustancias o tratar dichas células con uno o más tratamientos; y
- (e) determinar el efecto de dichas una o más sustancias o dichos uno o más tratamientos sobre uno o más atributos de dichas células diana.
- 15 50. El método del artículo 1, en el que dicha zona de detección comprende un material seleccionado del grupo que consiste en vidrio, plástico, la superficie de pocillos de placas de microtitulación, membranas altamente absorbentes, tiras de plástico, las superficies de tubos capilares, las superficies de cámaras microfluídicas y las superficies o canales microfluídicos.
51. El método del artículo 1, en el que la replicación de dichas células en dichas microcolonias se continúa tras dicha detección.
- 20 52. El método del artículo 1, en el que la etapa (c) comprende al menos dos ciclos cada uno de los cuales comprende un período en el que se deja que se repliquen las células seguido por una etapa de detección.
53. El método del artículo 1, que comprende además la etapa de repetir las etapas (a) - (c) con una o más muestras adicionales, en el que dicha repetición está automatizada.
- 25 54. El método del artículo 53, en el que dichas muestras se cargan automáticamente en un instrumento que comprende un detector.
55. El método del artículo 53, en el que dichas muestras se depositan automáticamente en una serie de zonas de detección que están físicamente asociadas y que se cargan automática y sucesivamente en un instrumento que comprende un detector.
- 30 56. El método del artículo 1, en el que dicha detección comprende iluminar una o más microcolonias para generar una señal detectable.
57. El método del artículo 56, en el que dicha detección detecta luz emitida, dispersada, reflejada o absorbida como resultado de la iluminación de dichas una o más microcolonias.
58. El método del artículo 1, en el que dicha detección detecta fluorescencia.
59. El método del artículo 58, en el que dicha fluorescencia es autofluorescencia emitida por dichas microcolonias.
- 35 60. El método del artículo 56, en el que dicha iluminación emplea uno o más láseres.
61. El método del artículo 56, en el que dicha iluminación emplea uno o más diodos emisores de luz.
62. El método del artículo 56, en el que dicha iluminación emplea una fuente de luz blanca.
63. El método del artículo 56, en el que dicha iluminación es a través de uno o más filtros ópticos que sólo dejan pasar longitudes de onda de luz seleccionadas.
- 40 64. El método del artículo 1, que comprende además la etapa, antes o durante la etapa (c), de poner en contacto dicha muestra con un resto de señalización que se asocia o bien directa o bien indirectamente con dichas células diana.
65. El método del artículo 64, en el que dicho resto de señalización está asociado con una molécula de unión a una categoría.
- 45 66. El método del artículo 1, que comprende además la etapa, antes o durante la etapa (c), de poner en contacto dicha muestra con una molécula de unión a una categoría bajo condiciones que permiten la formación de uno o más

complejos entre dicha molécula de unión a una categoría y uno o más sitios de unión específicos de categoría sobre una o más de dichas células diana.

67. El método del artículo 66, en el que dicha molécula de unión a una categoría comprende un anticuerpo, aptámero o ligando.
- 5 68. El método del artículo 66, en el que dicha molécula de unión a una categoría está marcada, o bien directa o bien indirectamente, con uno o más restos de señalización.
69. El método del artículo 68, que comprende además la etapa, antes de la etapa (c), de eliminar cualquier molécula de unión a una categoría no unida de dichos uno o más complejos.
- 10 70. El método del artículo 66, en el que dicha molécula de unión a una categoría es un miembro de un conjunto de moléculas de unión a una categoría, en el que dicho conjunto comprende una familia de moléculas de unión a una categoría específicas para cada categoría no solapante de células diana que van a detectarse.
71. El método del artículo 70, en el que cada una de dichas familias de moléculas de unión a una categoría está marcada con un resto de señalización que emite una señal de una clase de señal o firma de señal distintas.
- 15 72. El método del artículo 65, en el que dicho resto de señalización es una partícula o está físicamente asociado con una partícula.
73. El método del artículo 64, en el que dicho resto de señalización tiene un carácter de señalización fluorescente.
74. El método del artículo 73, en el que dicho resto de señalización se selecciona del grupo que consiste en fluoróforos orgánicos, fósforos regulados por incremento, lantánidos, puntos cuánticos, enzimas que generan un producto fluorescente a partir de sustratos no fluorescentes y partículas teñidas de manera fluorescente.
- 20 75. El método del artículo 73, en el que dicho resto de señalización es una tinción fluorescente para las células.
76. El método del artículo 64, en el que dicho resto de señalización tiene un carácter de señalización cromogénico.
77. El método del artículo 64, en el que dicho resto de señalización tiene un carácter de señalización quimioluminiscente.
- 25 78. El método del artículo 64, en el que dicho resto de señalización tiene un carácter de señalización de dispersión de luz.
79. El método del artículo 78, en el que dicho resto de señalización es una partícula de dispersión resonante de luz o una partícula de resonancia de plasmón.
80. El método del artículo 64, en el que dicho resto de señalización es una tinción de viabilidad para teñir células vivas.
- 30 81. El método del artículo 70, en el que dicho conjunto de moléculas de unión a una categoría tiene una complejidad de familia de 1.
82. El método del artículo 70, en el que dicho conjunto de moléculas de unión a una categoría tiene una complejidad de familia que es mayor de 1.
83. El método del artículo 82, en el que dicho conjunto tiene una complejidad de familia ≥ 5 .
- 35 84. El método del artículo 64, en el que dicho resto de señalización comprende uno o más compuestos que no pueden detectarse hasta su asociación con dichas células diana, actuando sobre dicho resto de señalización un constituyente de dichas células diana o un estado fisiológico, físico o micromedioambiental de dichas células diana.
85. El método del artículo 1, en el que dicha replicación y dicha detección se producen en un recipiente construido de modo que no se permite que entren células adicionales ni que salgan células de la muestra.
- 40 86. El método del artículo 1, en el que dicha replicación y dicha detección se producen en un recipiente que tiene un código de barras o marcador equivalente para seguir la muestra automáticamente.
87. El método del artículo 1, en el que dicha replicación y dicha detección se producen sobre una superficie con marcas de registro para facilitar la alineación de múltiples imágenes de la misma superficie.
- 45 88. El método del artículo 1, en el que dicha detección detecta marcas de control o células control en una región especificada de la zona de detección.
89. El método del artículo 1, en el que dicha detección emplea filtros ópticos adaptados para detectar una señal que proviene de la iluminación de dichas células diana.

90. El método del artículo 1, en el que dicha detección emplea un detector fotoeléctrico.
91. El método del artículo 1, en el que dicha detección emplea un detector de matriz fotoeléctrica.
92. El método del artículo 91, en el que dicho detector fotoeléctrico comprende un detector de CCD.
93. El método del artículo 1, en el que dicha detección no emplea un intensificador de imágenes.
- 5 94. El método del artículo 1, en el que dicha detección emplea un detector de tubo fotomultiplicador.
95. El método del artículo 1, en el que dicha detección emplea un detector de fotodiodos.
96. El método del artículo 1, en el que dicha detección emplea una película fotosensible.
97. El método del artículo 1, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (c), de cuantificar el número de microcolonias.
- 10 98. El método del artículo 1, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (c), de determinar la categoría de dichas células diana analizando una imagen de dicha área de detección usando software de análisis de imágenes.
99. El método del artículo 1, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (c), de determinar las ubicaciones en la zona de detección de dichas una o más microcolonias analizando una imagen de dicha área de detección usando software de análisis de imágenes.
- 15 100. El método del artículo 99, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (c), de comparar dichas ubicaciones en la zona de detección de microcolonias individuales con ubicaciones previamente determinadas de las mismas microcolonias.
101. El método del artículo 100, en el que dicho software de análisis de imágenes comprende algoritmos para distinguir objetos que cambian de tamaño a lo largo del tiempo de objetos que no cambian de tamaño a lo largo del tiempo.
- 20 102. El método del artículo 97, en el que dicha determinación comprende analizar una imagen de dicha área de detección.
103. El método del artículo 43, en el que dicho tratamiento de esterilización se selecciona del grupo que consiste en esterilización por calor, irradiación, exposición a gas tóxico y tratamiento con desinfectante.
- 25

La divulgación también muestra un método para detectar células diana vivas en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:

30 (a) proporcionar células diana vivas presentes en dicha muestra en una zona de detección que comprende un área de detección a una densidad inferior a 100 células diana por mm^2 del área de detección, en el que dentro de dicha zona de detección dichas células están dispersadas e inmovilizadas al azar;

(b) permitir la formación de una o más microcolonias de dichas células diana mediante replicación *in situ*; y

(c) detectar dichas una o más microcolonias;

35 en el que la dimensión lineal más larga de dicha área de detección es mayor de 1 mm; dichas una o más microcolonias tienen una medida media inferior a 50 micras en al menos dos dimensiones ortogonales; dicha detección no supone un aumento de más de 5x; dicha detección detecta una propiedad de dichas una o más microcolonias que no depende de la adición de un resto de señalización o una molécula de unión a una categoría; y dichas células en dichas una o más microcolonias siguen siendo competentes para replicarse tras dicha detección.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar células diana vivas en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) proporcionar células diana vivas presentes en dicha muestra en una zona de detección que comprende un área de detección a una densidad inferior a 100 células diana por mm² del área de detección, en el que dentro de dicha zona de detección dichas células están dispersadas e inmovilizadas al azar;
 - (b) permitir la formación de una o más microcolonias de dichas células diana mediante replicación *in situ*;
 - (c) marcar dichas una o más microcolonias con un reactivo de marcaje; y
 - (d) detectar dichas una o más microcolonias detectando la señal generada mediante dicho reactivo de marcaje;
- 5 en el que la dimensión lineal más larga de dicha área de detección es mayor de 1 mm; dichas una o más microcolonias tienen una medida media inferior a 50 micras en al menos dos dimensiones ortogonales; en el que dicha detección no supone un aumento de más de 5x; en el que dichas células en dichas una o más microcolonias siguen siendo competentes para replicarse tras dicha detección; y en el que dicho método de detección no emplea barrido láser.
- 10
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células diana están dispersadas al azar en una zona de detección a una densidad inferior a 1 célula diana por mm² del área de detección.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha detección detecta una única microcolonia en el área de detección.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células diana son células bacterianas o eucariotas, en particular células de los hongos, animales o vegetales.
- 20
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra se obtiene mediante muestreo de aire o agua medioambiental, o de superficies, objetos u organismos expuestos al medioambiente, o dicha muestra se obtiene de un material seleccionado del grupo que consiste en material de partida, terminado o en proceso en la fabricación de productos farmacológicos, cosméticos, sanguíneos u otros para uso tópico o interno en seres humanos o animales; material de partida, en proceso o terminado en la fabricación de alimentos o bebidas; material de partida, en proceso o terminado en la fabricación de dispositivos médicos o de diagnóstico *in vitro*, productos químicos; superficies industriales; instrumentación; y maquinaria.
- 25
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha zona de detección comprende un material seleccionado del grupo que consiste en vidrio, plástico, membranas absorbentes, o tiras de plástico.
- 30
7. El método de la reivindicación 1, en el que la replicación de dichas células en dichas microcolonias se continúa tras dicha detección.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha detección comprende iluminar una o más microcolonias para generar una señal detectable, por ejemplo, fluorescencia.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicha iluminación emplea uno o más láseres o diodos emisores de luz o una fuente de luz blanca.
- 35
10. El método de la reivindicación 1, en el que dicho reactivo de marcaje se une a constituyentes moleculares de dichas células diana, en particular, una tinción para detectar actividad enzimática, tal como una tinción de esterasa fluorógena.
11. El método de la reivindicación 1, en el que dicho reactivo de marcaje se añade a medios nutritivos de modo que dichas células diana se exponen a dicho reactivo de marcaje durante el crecimiento.
- 40
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicha detección emplea filtros ópticos adaptados para detectar la señal que proviene de la iluminación de dichas células diana.
13. El método de la reivindicación 1, en el que dicha detección emplea un detector fotoeléctrico, en particular un detector de matriz fotoeléctrica.
- 45
14. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (d), de cuantificar el número de microcolonias.
15. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa, durante o tras la etapa (d), de detectar las microcolonias que crecen a lo largo del tiempo.

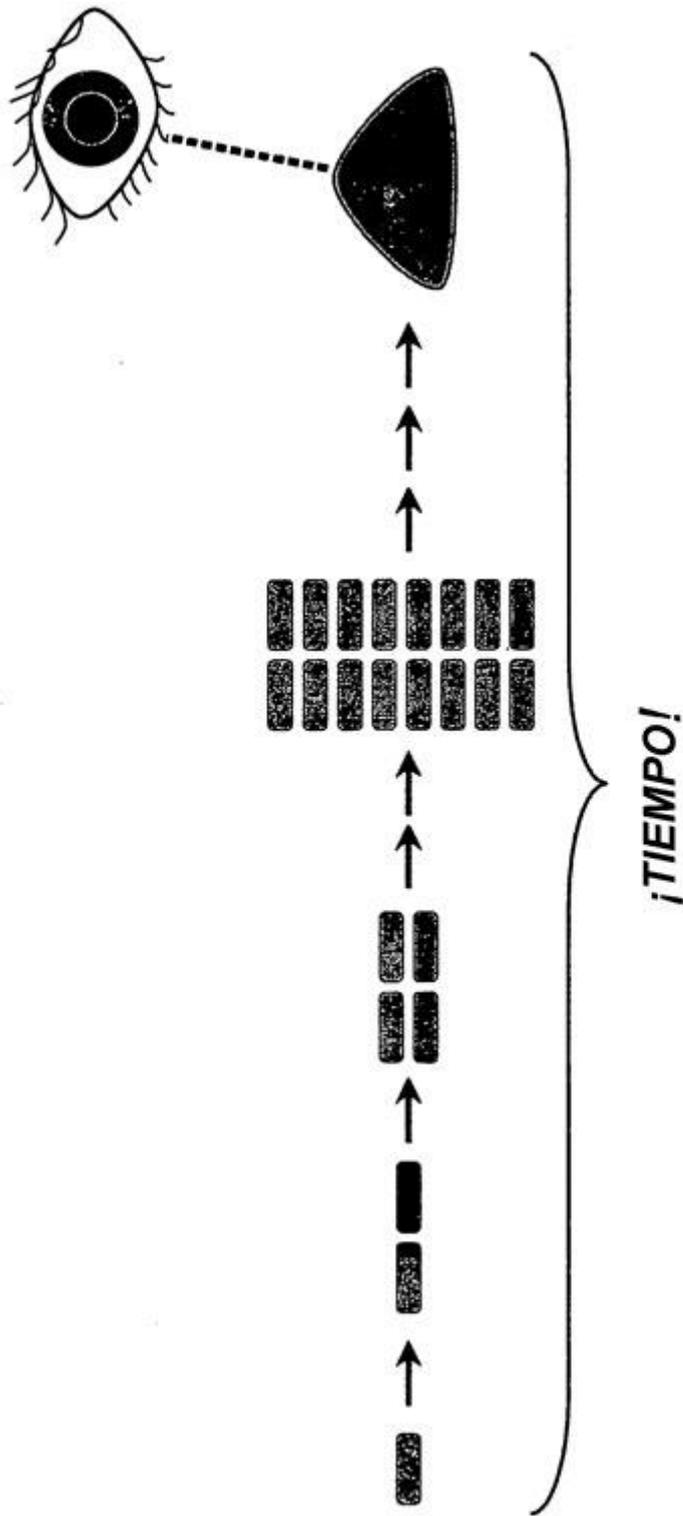


FIG. 1. El cultivo microbiano tradicional requiere muchas generaciones de división celular

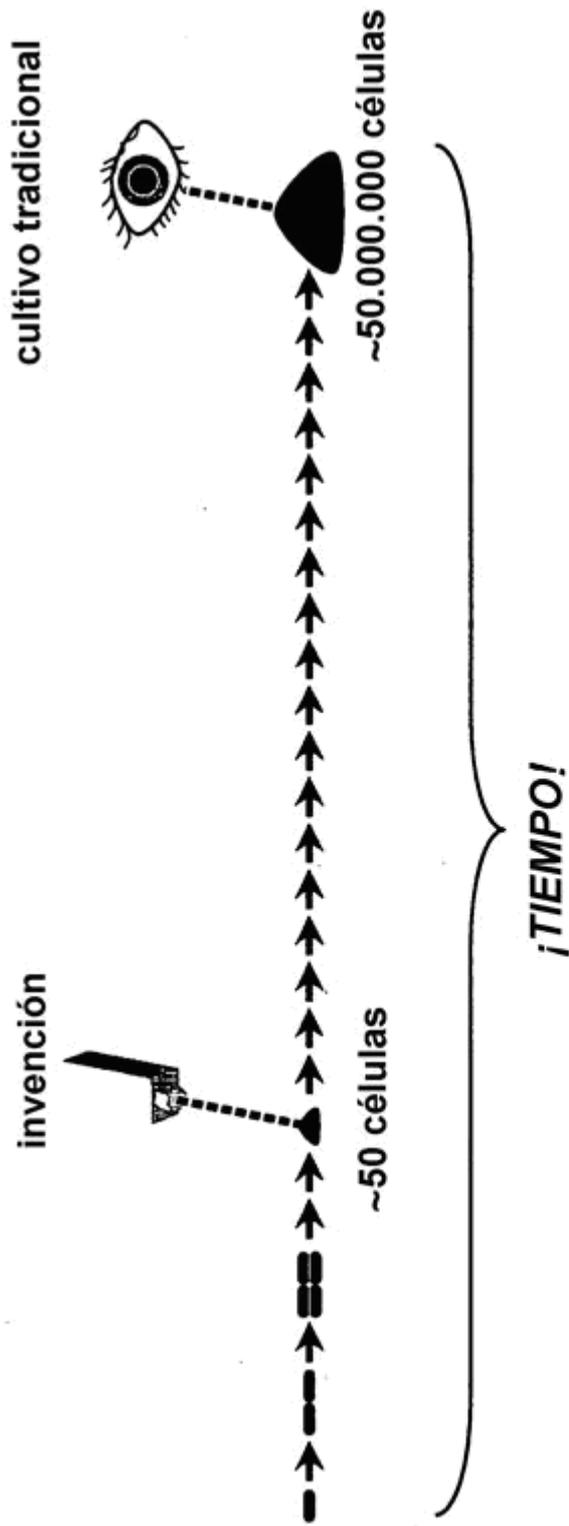


FIG. 2. El concepto de detección rápida del crecimiento microbiano detectando microcolonias.

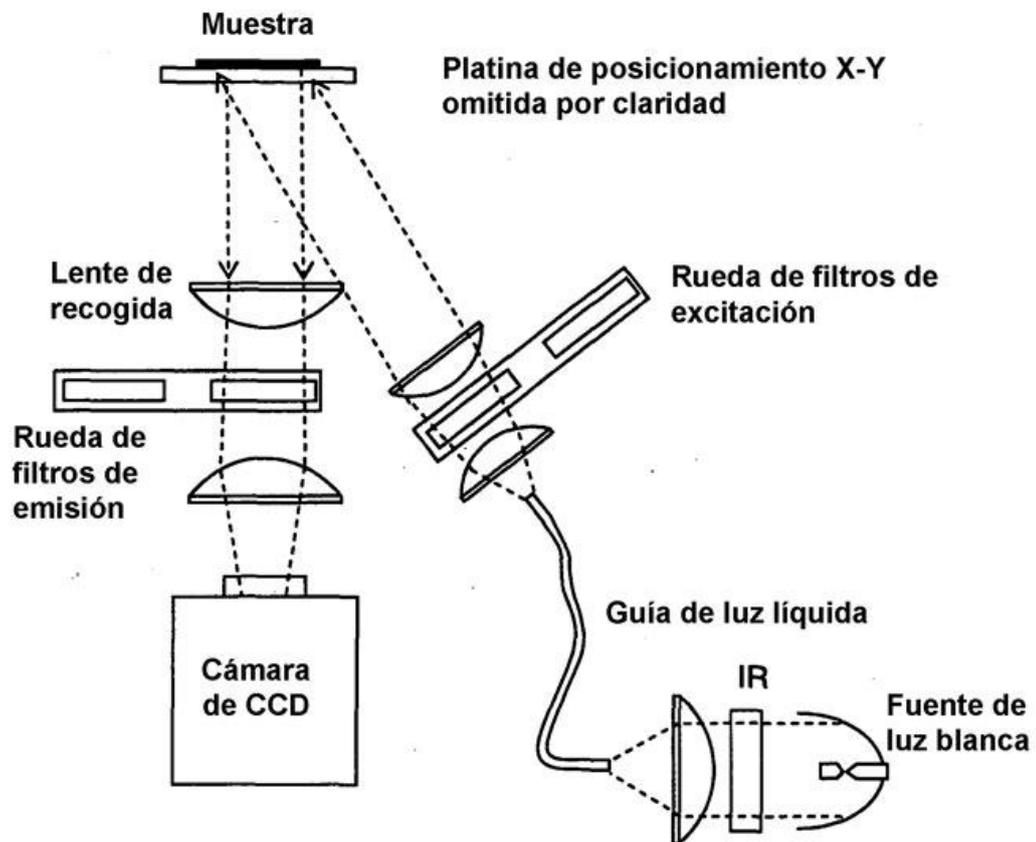


FIG. 3. Un dispositivo de obtención de imágenes de CCD para la obtención de imágenes de grandes áreas.

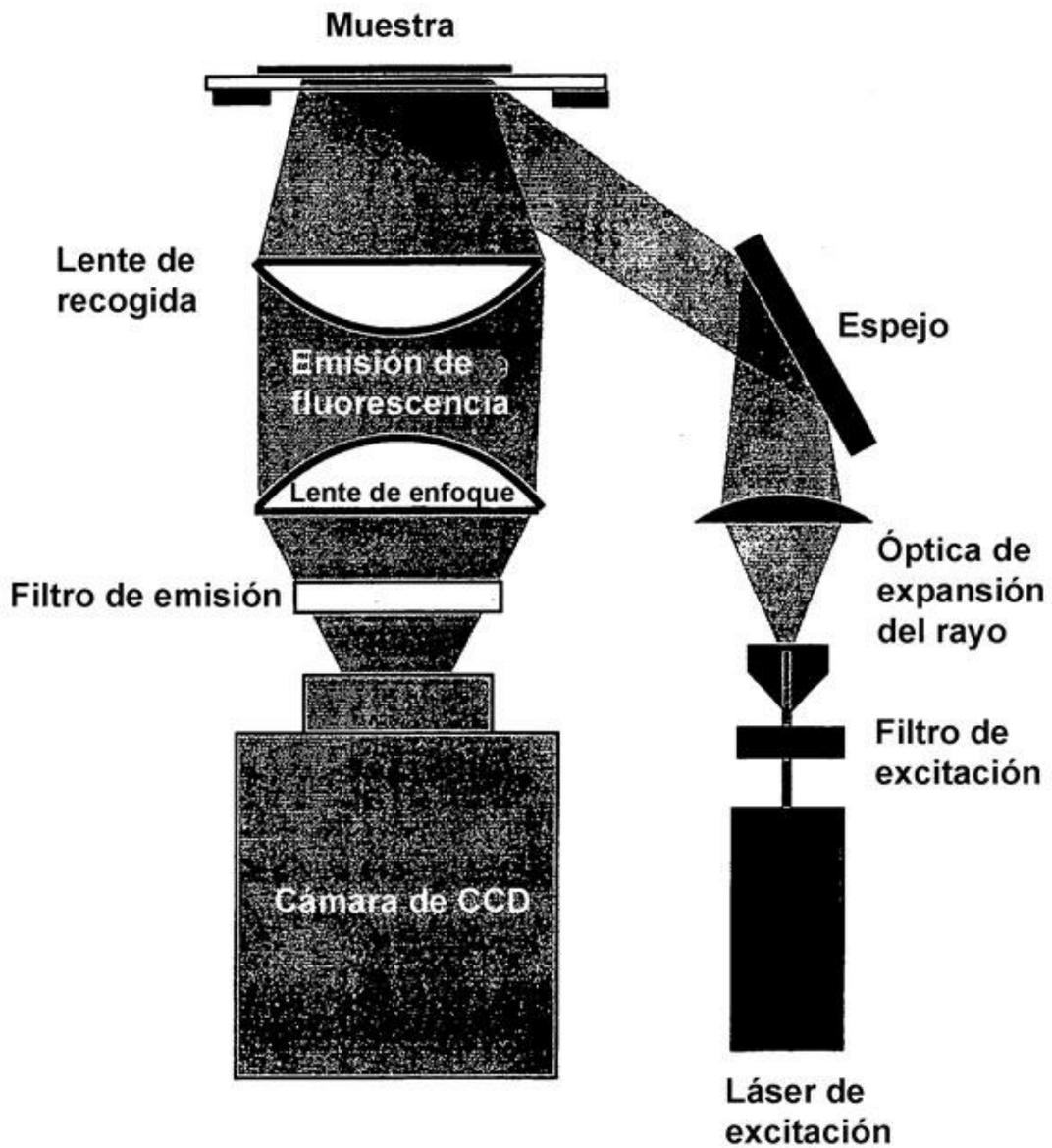


FIG. 4. Un sistema de obtención de imágenes de CCD para la obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

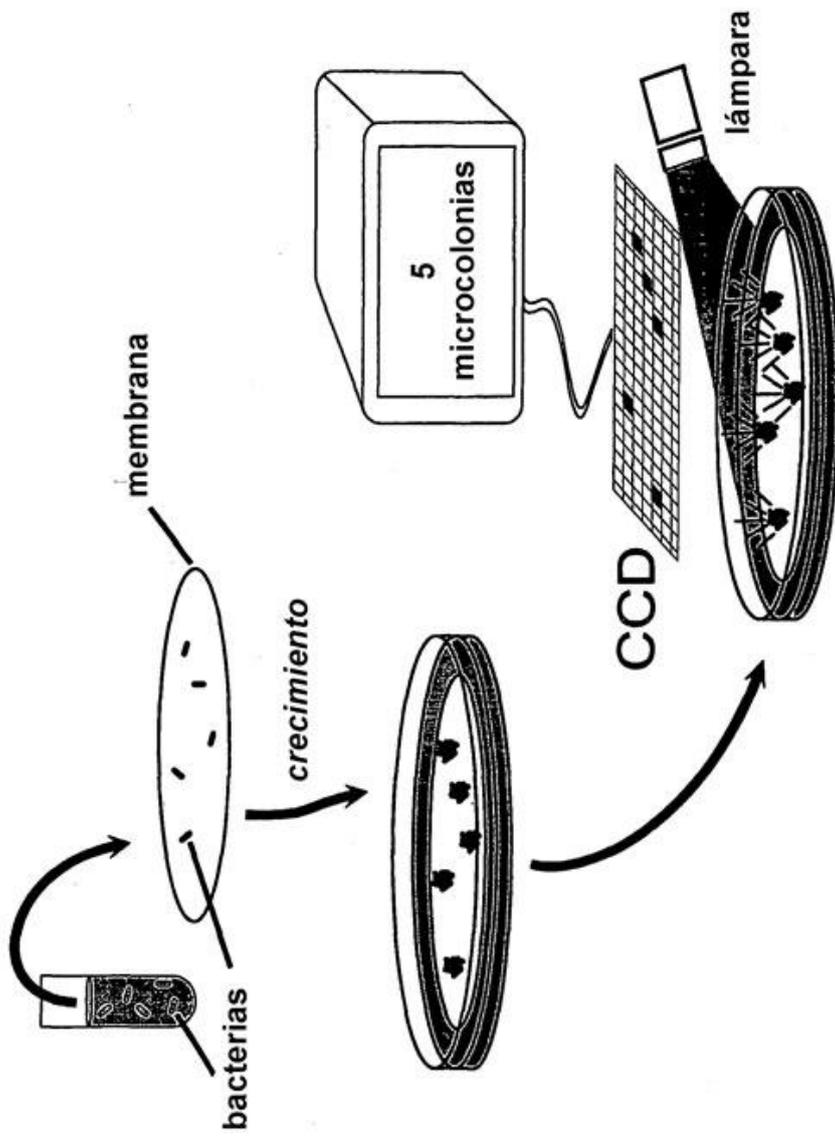
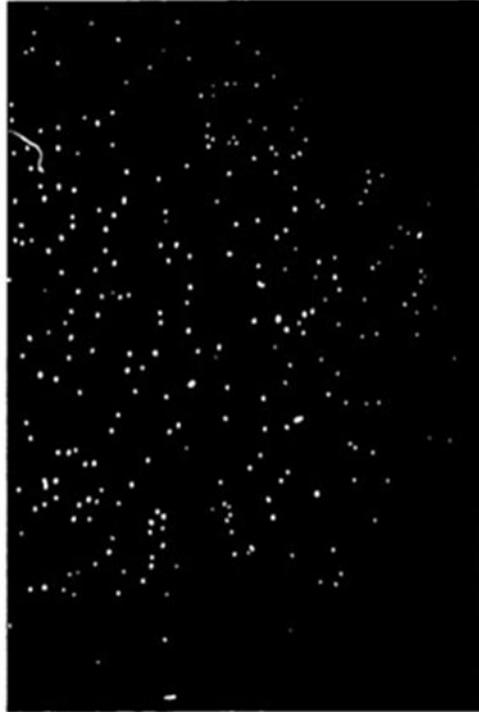


FIG. 5. Detección sin reactivos de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas

microcolonias bacterianas
crecimiento a las 5,25 h



sin bacterias

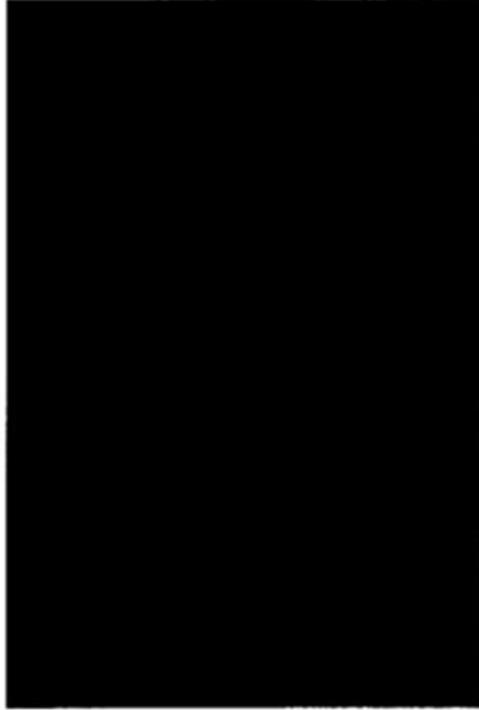
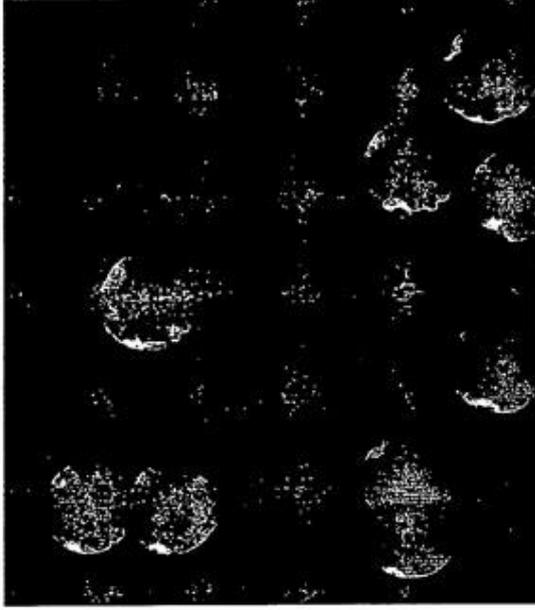


FIG. 7. Detección basada en autofluorescencia de microcolonias de bacterias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (ejemplo 2)



**microcolonias
autofluorescentes
a las 5 h**



**macrocolonias
visibles
a las 20 h**

FIG. 8. Un método sencillo para validar una prueba de enumeración microbiana rápida sin reactivos usando una comparación interna con el método de cultivo tradicional (ejemplo 3).

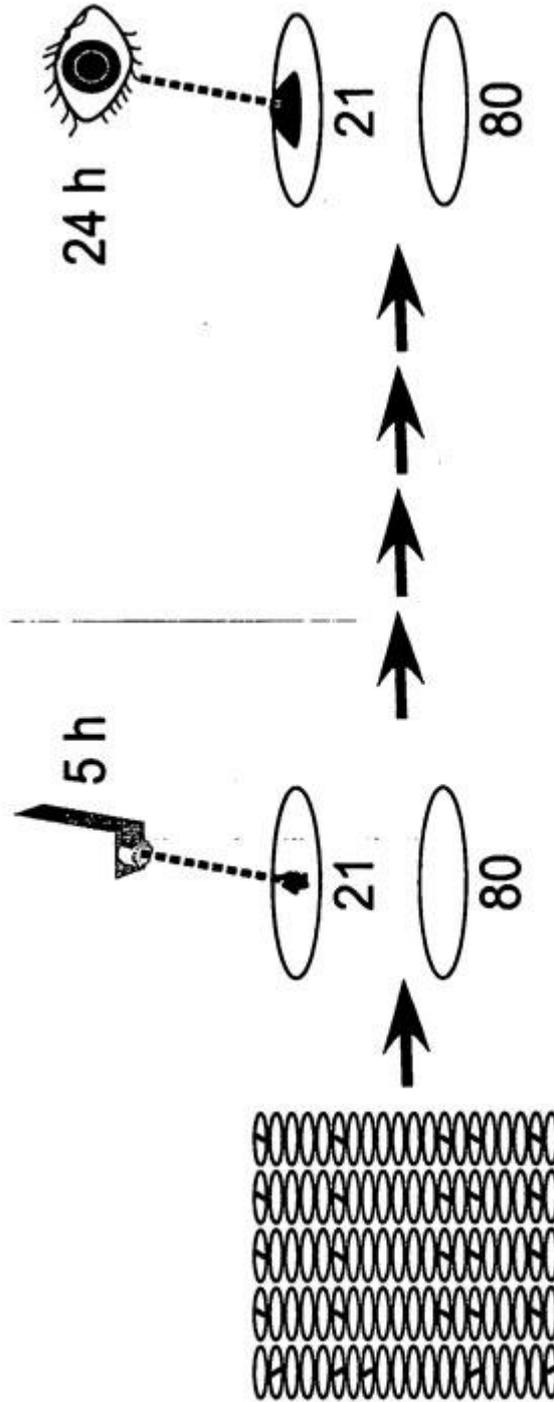


FIG. 9. Exactitud y límite de detección de la detección de microcolonias autofluorescentes usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (ejemplo 4)

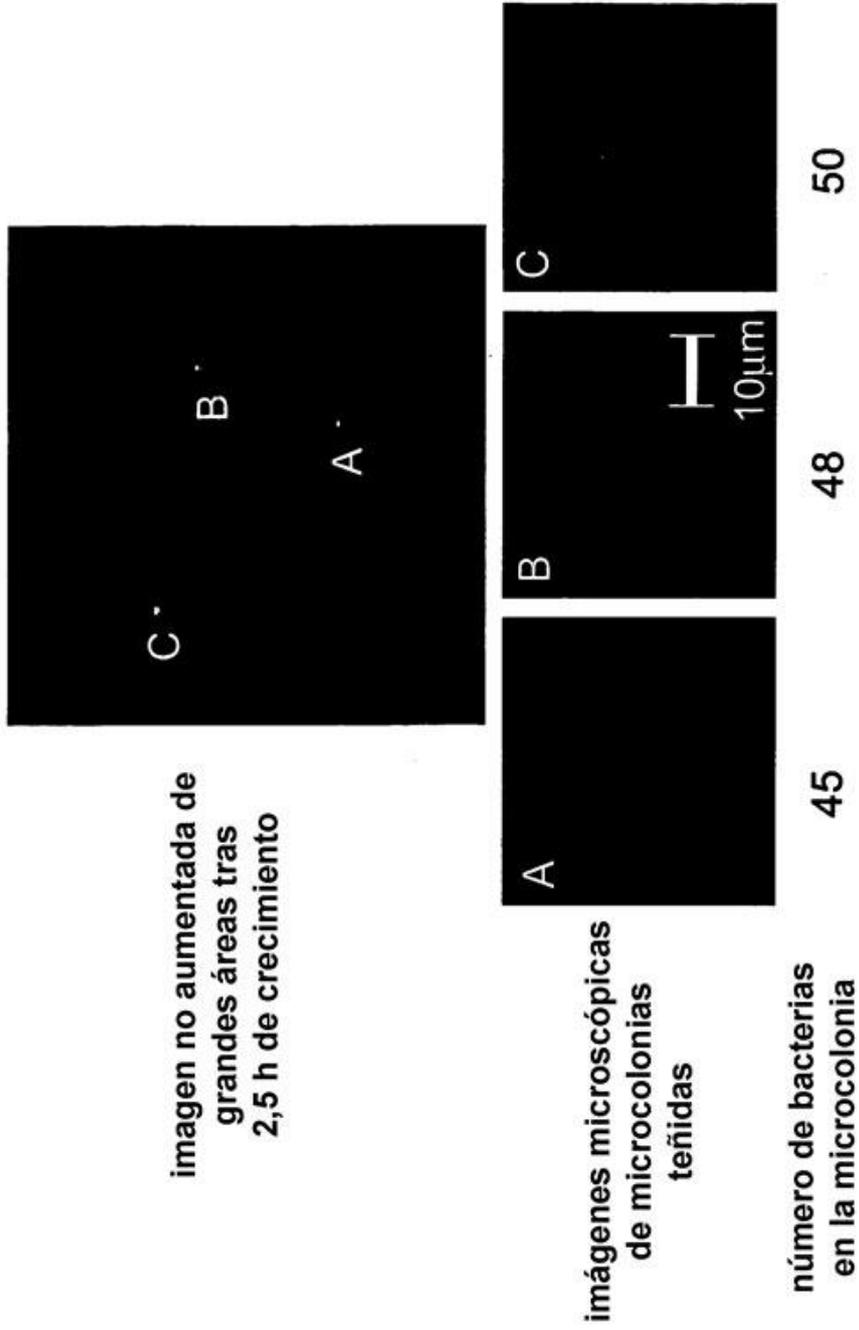


FIG. 10. Determinación del número de células microbianas en microcolonias bacterianas autofluorescentes detectadas rápidamente usando obtención de imágenes no aumentadas sin reactivos (ejemplo 5)

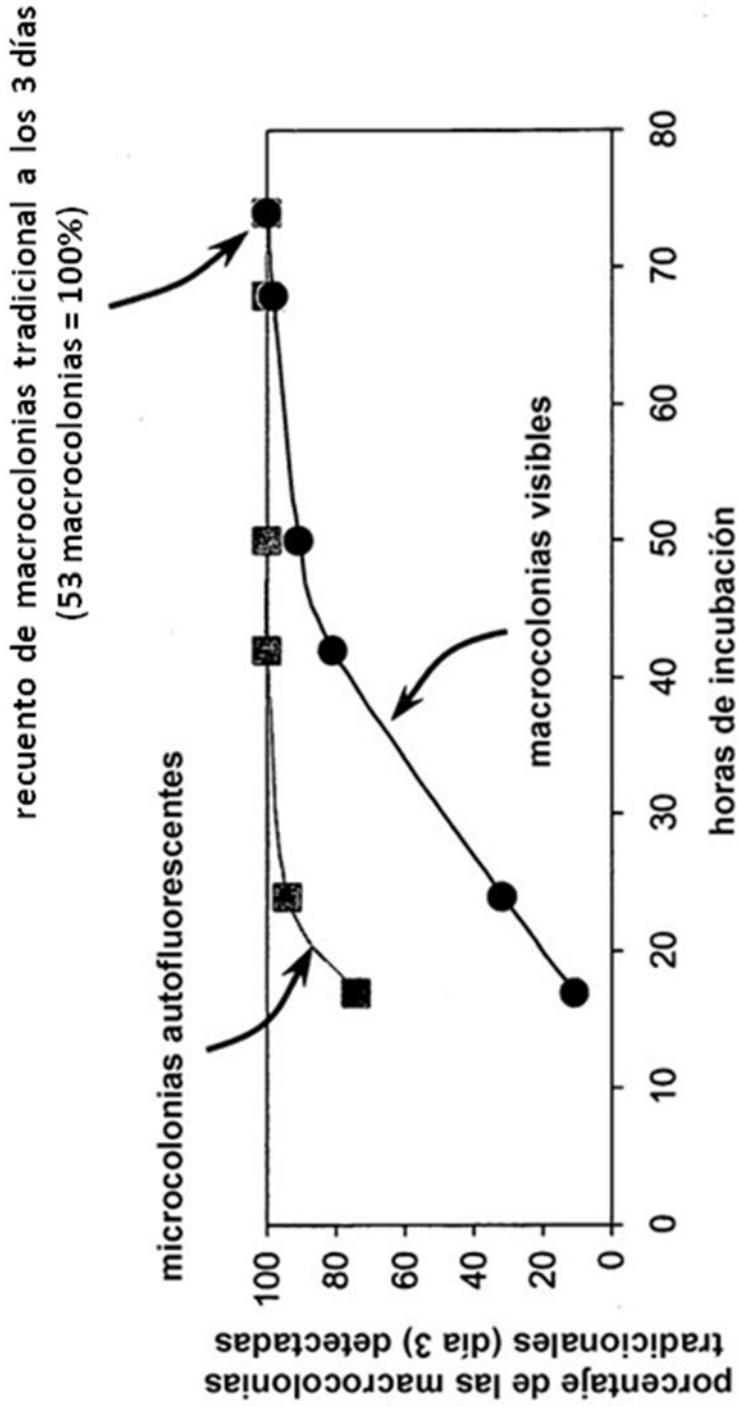


FIG. 11. Enumeración de bacterias en una muestra de agua medioambiental (ejemplo 6)

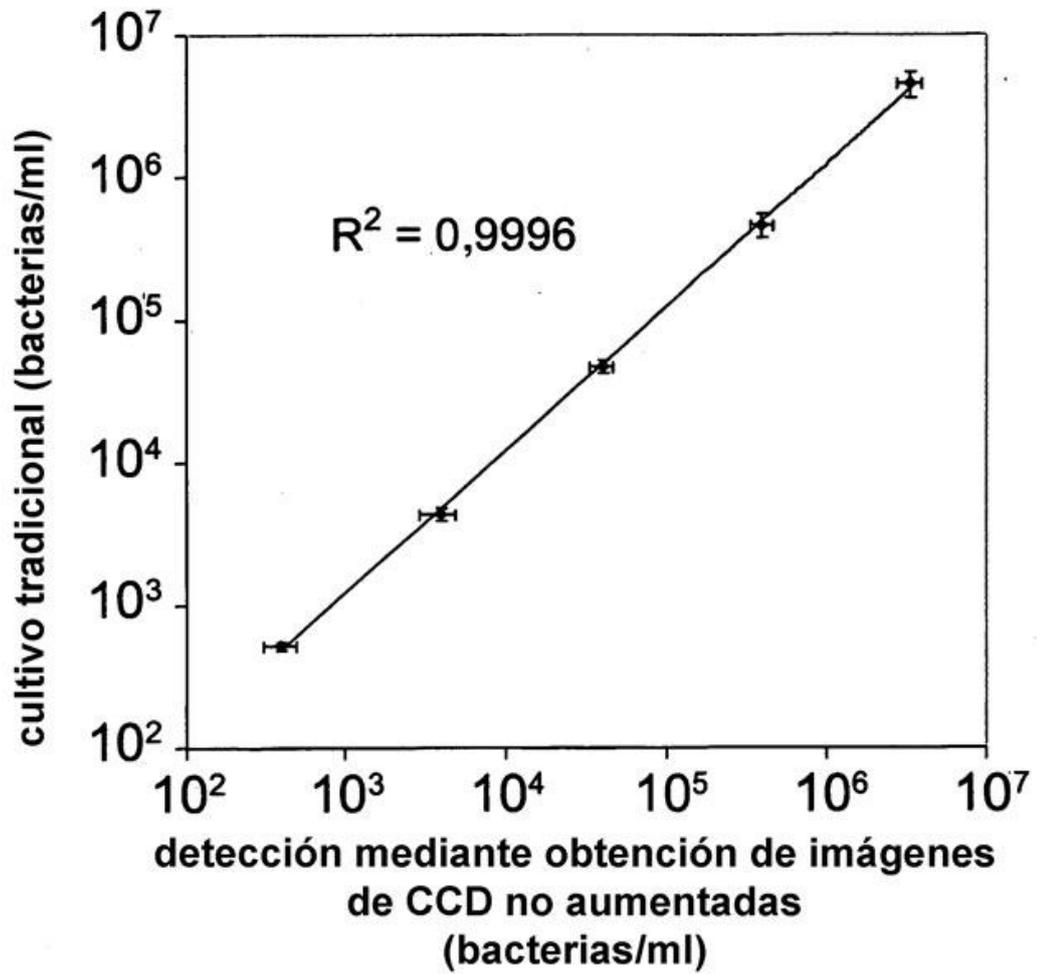


FIG. 12. Correlación entre pruebas de enumeración usando la invención y el cultivo tradicional (ejemplo 7)

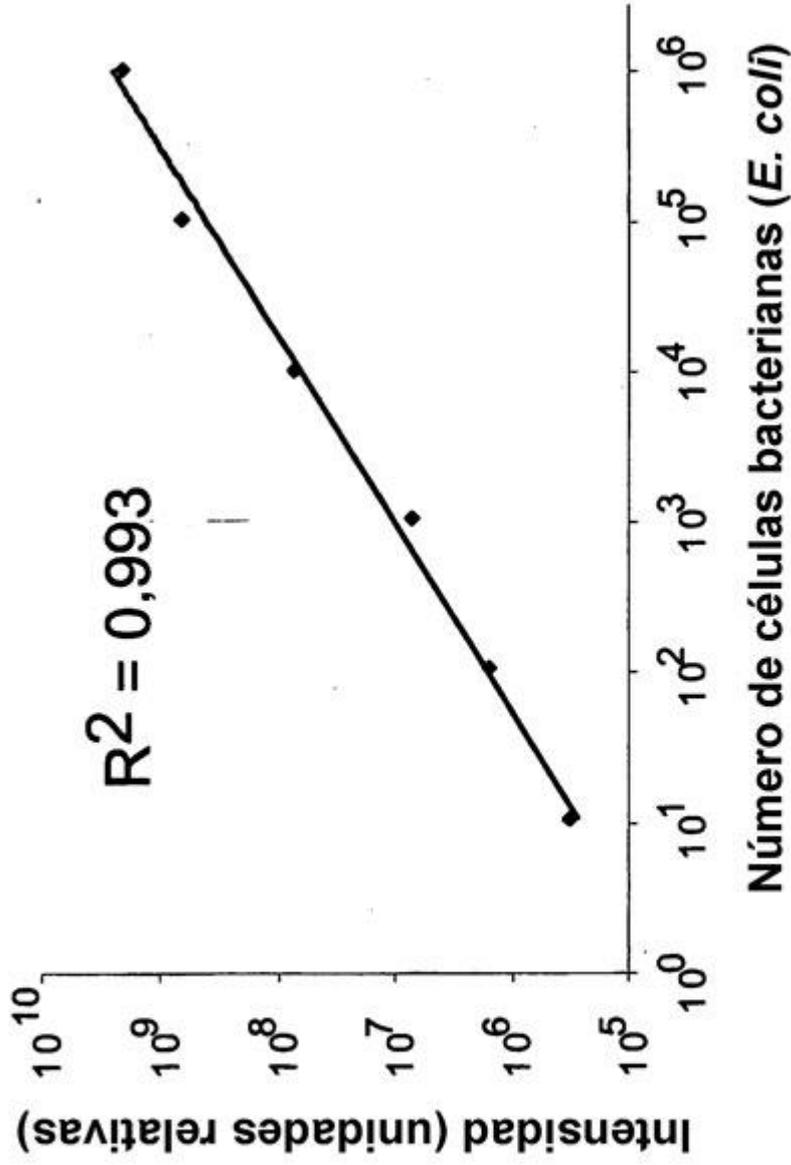


FIG. 13. Linealidad e intervalo dinámico de una prueba de enumeración sin reactivos (ejemplo 8)

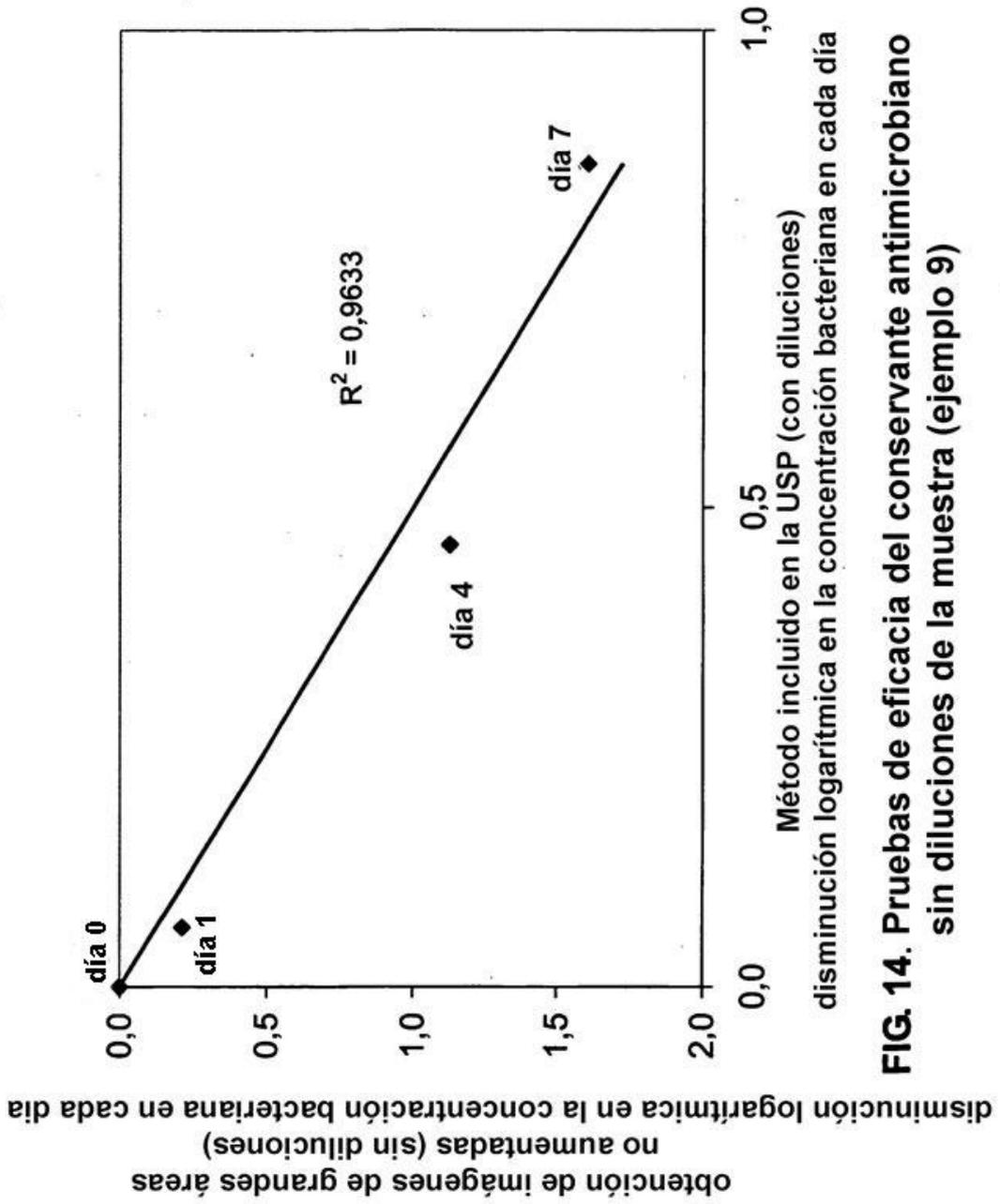


FIG. 14. Pruebas de eficacia del conservante antimicrobiano sin diluciones de la muestra (ejemplo 9)

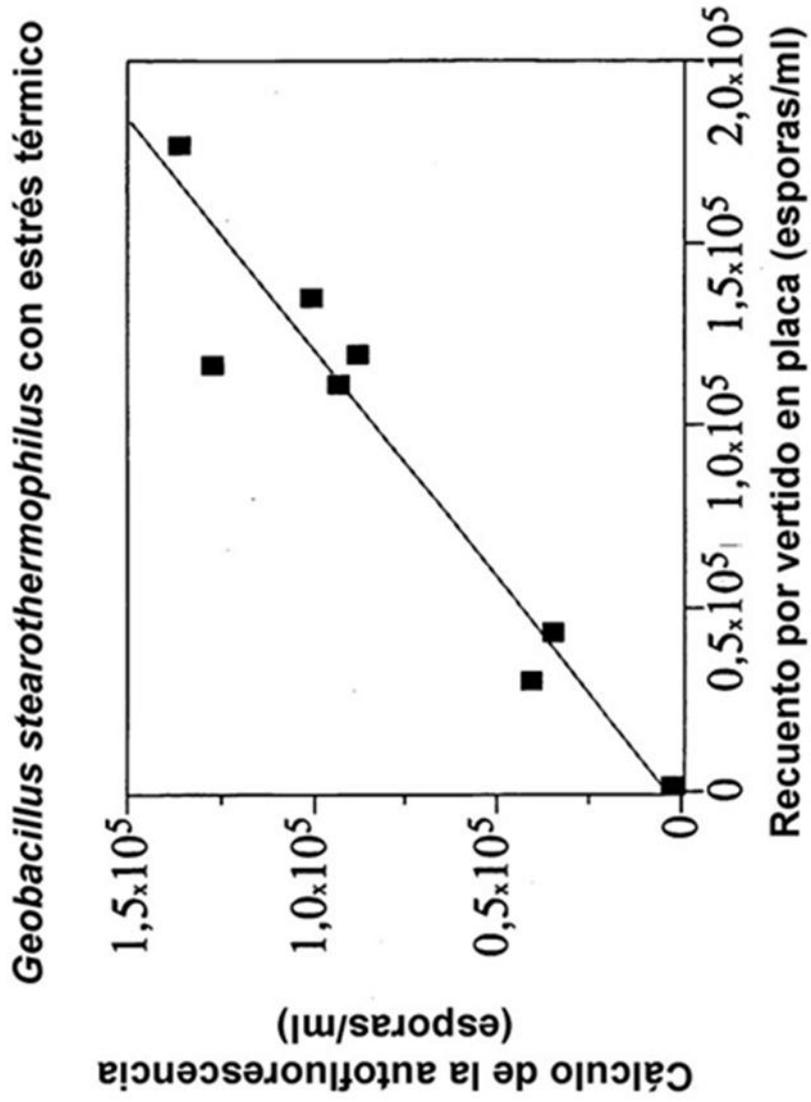


FIG. 15. Detección basada en autofluorescencia de un biológico con estrés térmico usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (ejemplo 10)

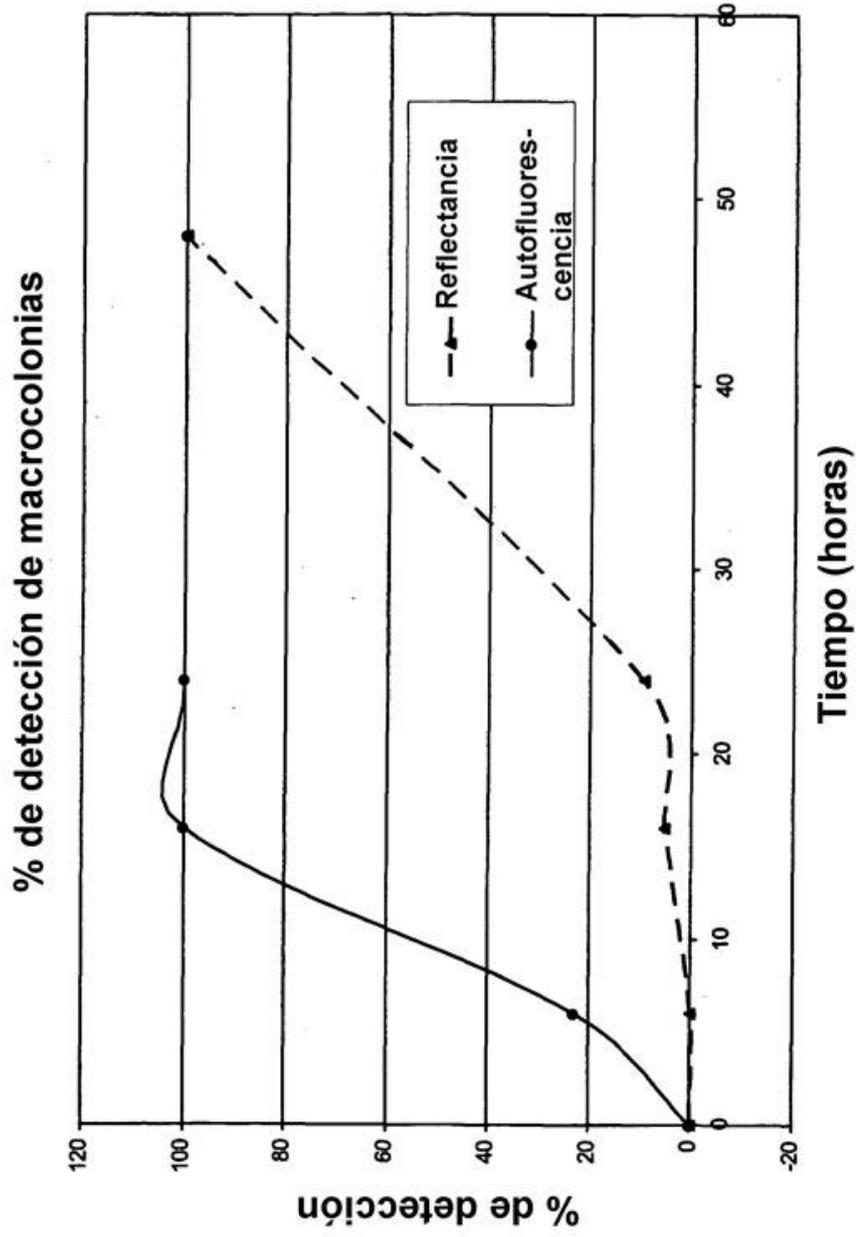


FIG. 16. Detección basada en autofluorescencia de microcolonias bacterianas en carne picada (ejemplo 11)

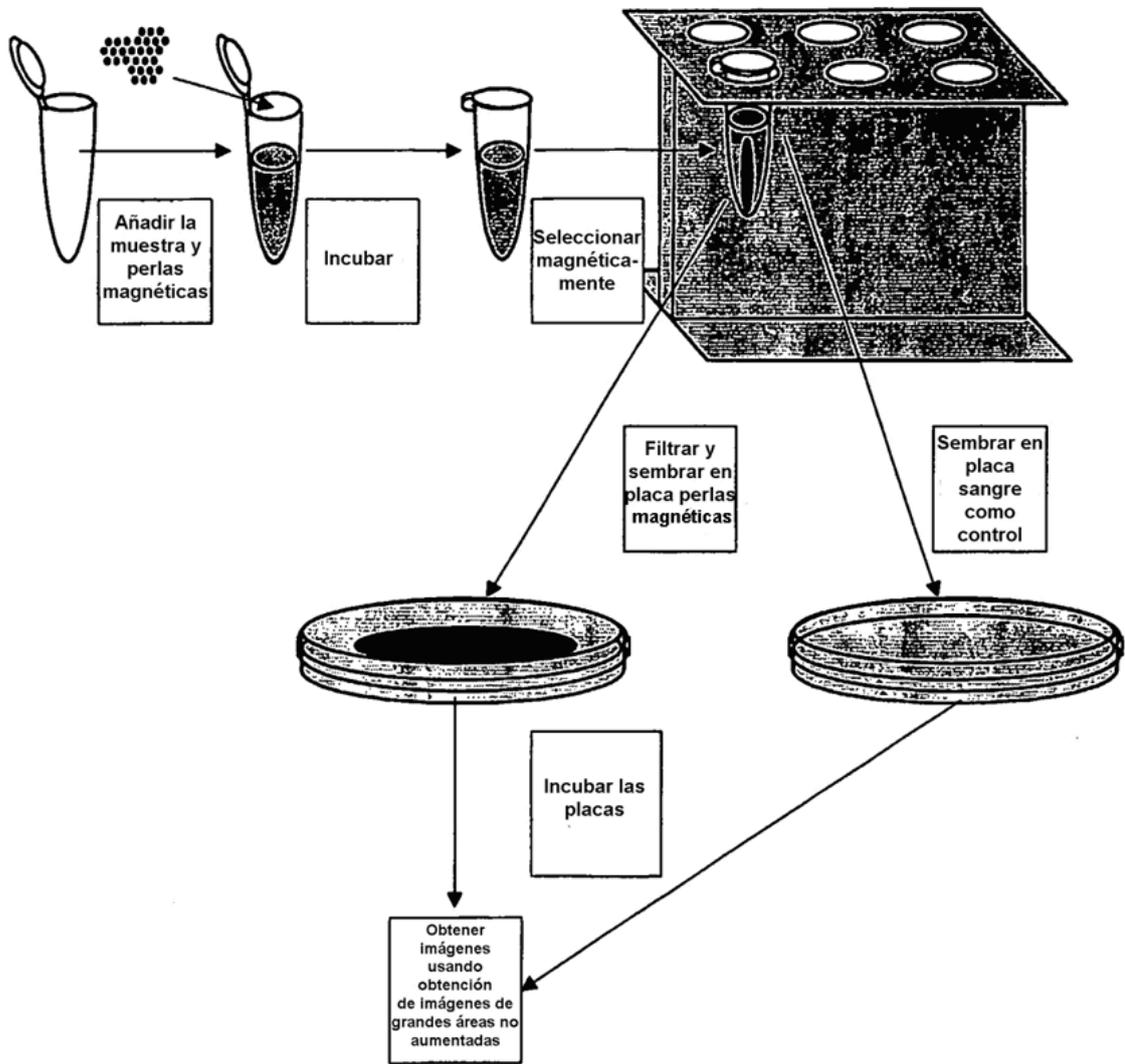


FIG. 17. Selección magnética seguida por detección de microcolonias (ejemplo 12)

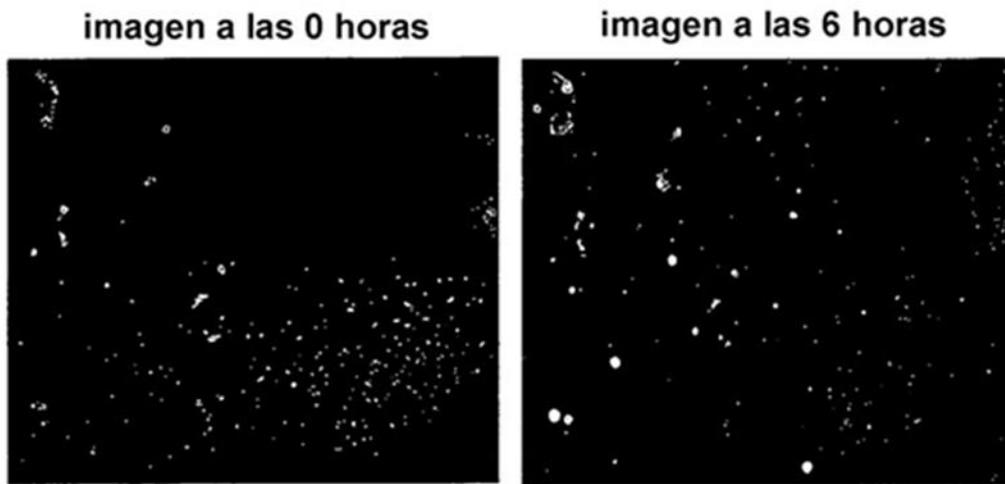


FIG. 18. Detección de bacterias en una muestra compleja con selección magnética no específica seguida por detección de microcolonias usando obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (ejemplo 12)

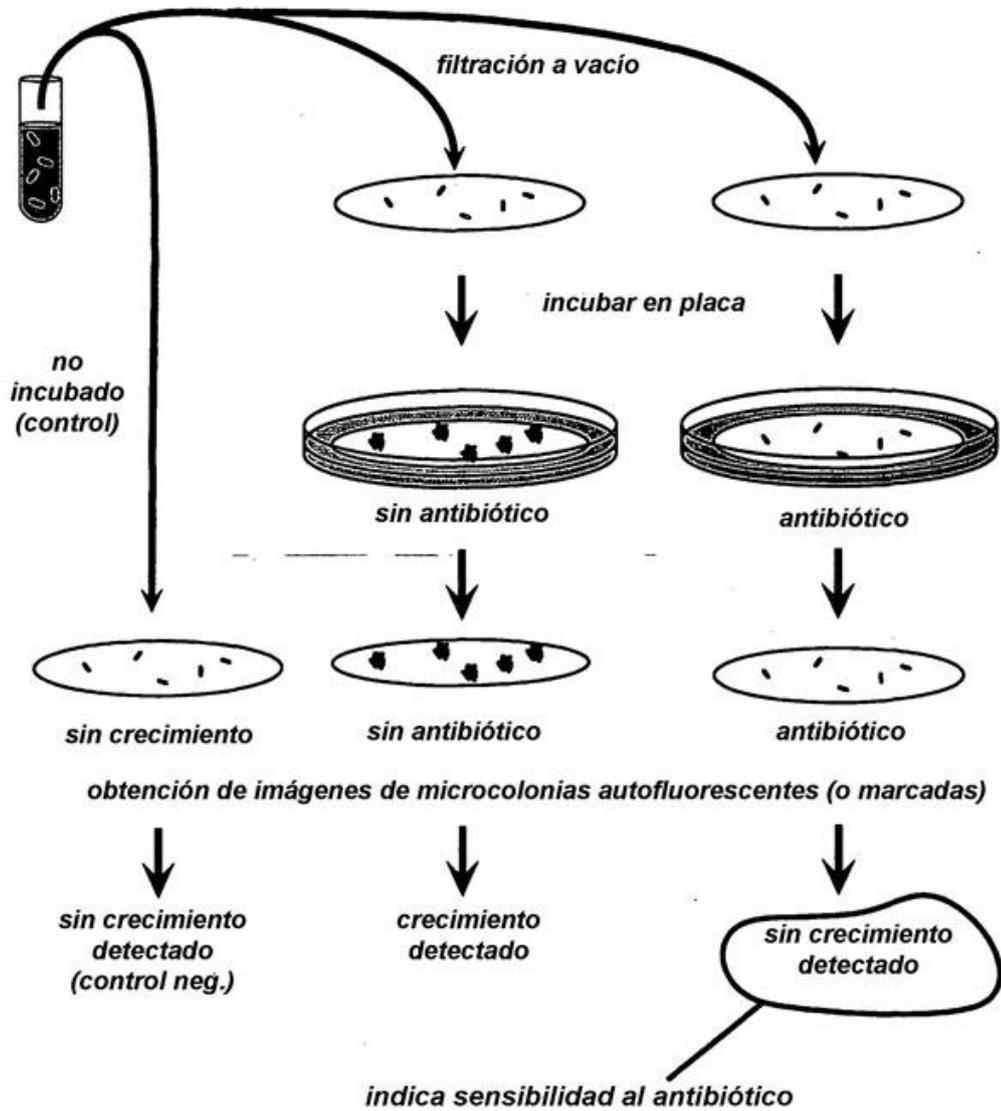


FIG. 19.
Esquema para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas (ejemplo 13)

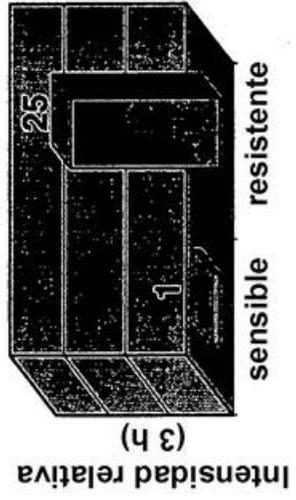
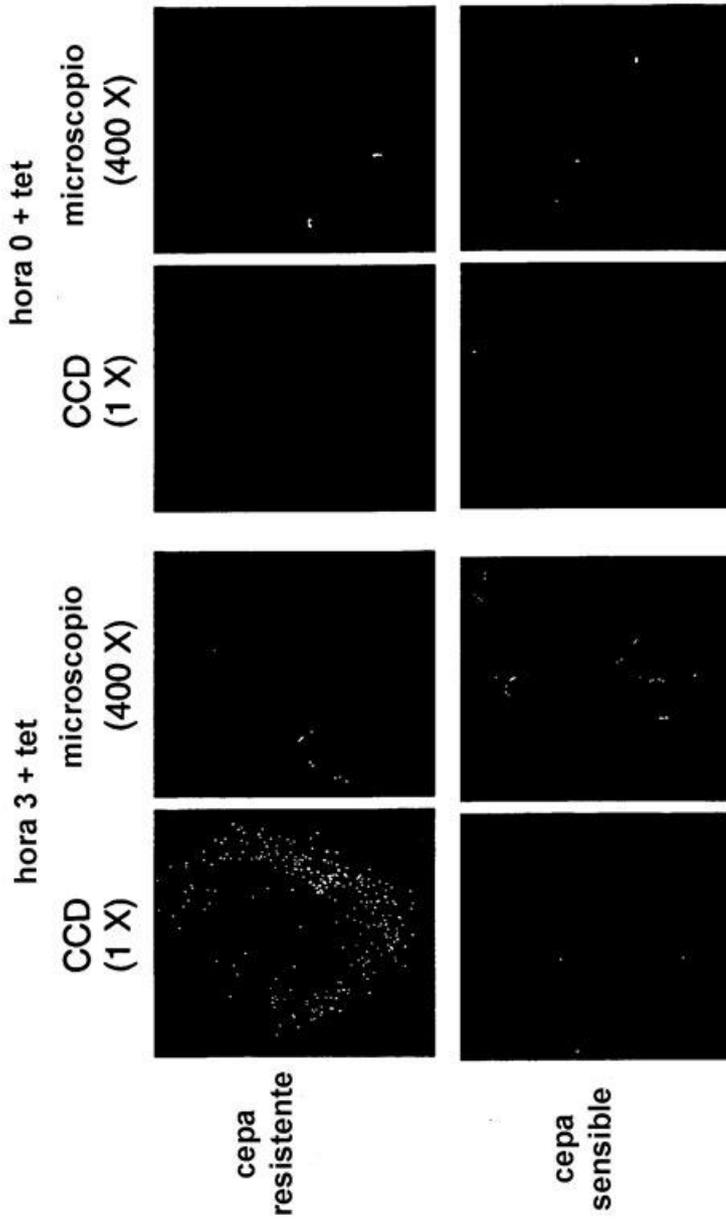


FIG. 20. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas (ejemplo 13).

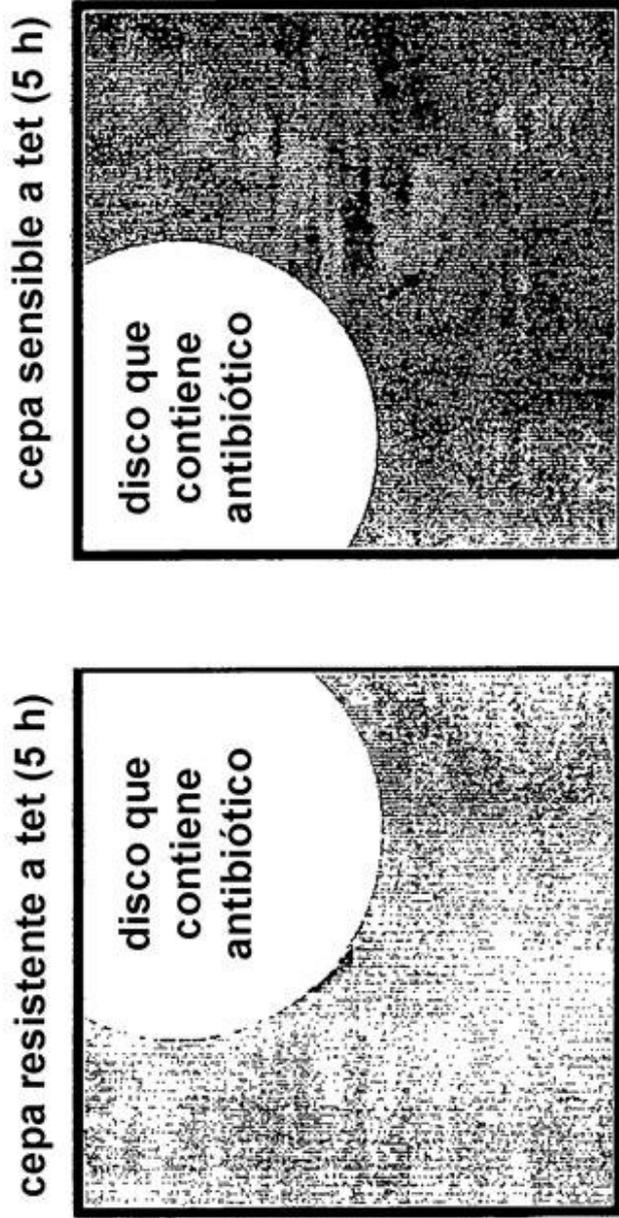


FIG. 21. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas usando el método de difusión de disco y obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (ejemplo 14)

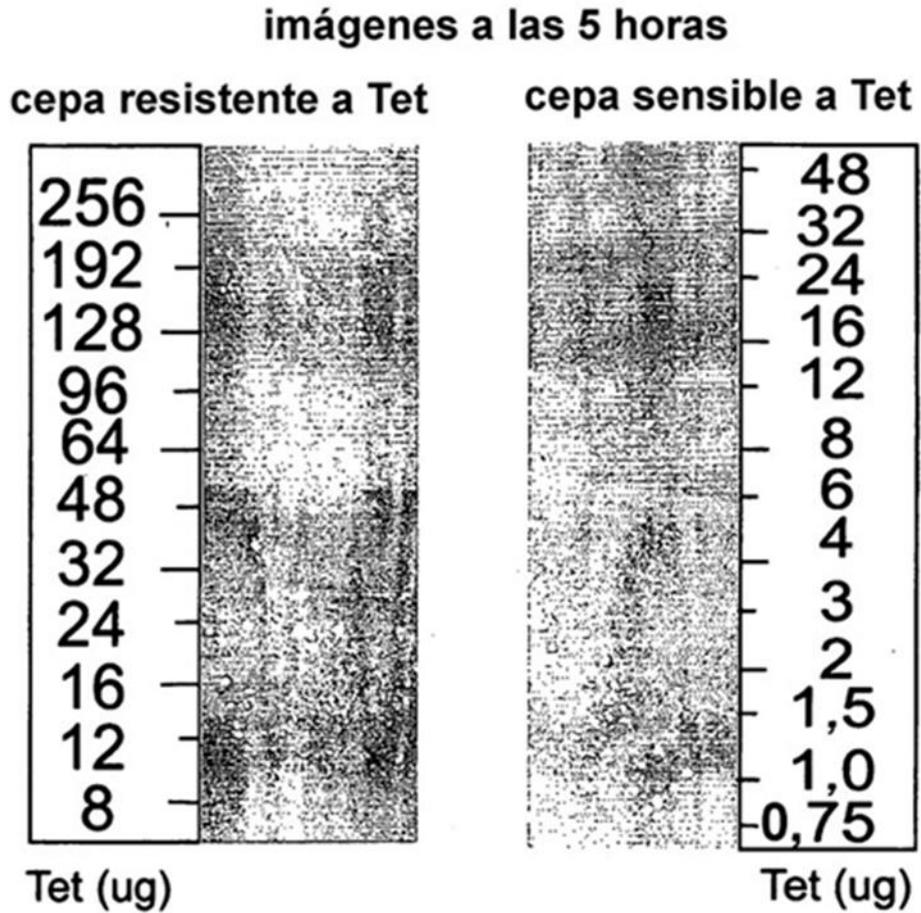


FIG. 22. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana rápidas usando el E-test™ y obtención de imágenes de grandes áreas no aumentadas (ejemplo 15)