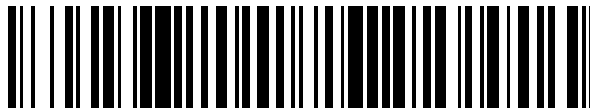


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 055**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2009 E 09729050 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2252892**

54 Título: **Procedimiento de detección en tiempo real de microorganismos en un medio de cultivo líquido por aglutinación**

30 Prioridad:

14.03.2008 FR 0851655

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

16.02.2015

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'etoile, FR**

72 Inventor/es:

**COLIN, BRUNO;
MOSTICONE, DAVID;
RAYMOND, JEAN-CLAUDE;
SOFIA, THIERRY y
VIMONT, ANTOINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 529 055 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección en tiempo real de microorganismos en un medio de cultivo líquido por aglutinación

5 El campo de la invención es el del control microbiológico clínico o industrial. Más particularmente, se trata de un método que permite identificar uno o varios microorganismos mediante una reacción de aglutinación efectuada simultáneamente con el enriquecimiento de la muestra en microorganismos.

10 El análisis microbiológico necesita unas técnicas precisas y cuyo tiempo de obtención del resultado debe ser lo más corto posible.

15 En el campo médico, es necesario prever y diagnosticar el riesgo infeccioso: cuanto más rápido y preciso sea el diagnóstico, más eficaz será el tratamiento de los enfermos y más minimizado estará el riesgo de transmisión. El enfoque es similar para la salud animal.

20 En el campo agroalimenticio, las condiciones son idénticas. Distingue sin embargo los microorganismos patógenos y sus toxinas, cuya búsqueda se aplica a los productos comercializados, los microorganismos no patógenos, utilizados como indicadores de calidad del proceso de producción, desde los productos brutos hasta los productos finales, a lo largo de la cadena, y las bacterias de interés tecnológico, tales como los fermentos. La detección rápida y precisa de presuntas contaminaciones permite controlarlas e iniciar así acciones correctivas.

25 Técnicamente, el análisis microbiológico puede aplicar una o varias fases de pre-enriquecimiento/enriquecimiento, una o varias fases de detección, una o varias fases de enumeración de los microorganismos. Para aplicaciones particulares, tales como el control microbiológico agroalimenticio, puede requerirse también una fase de confirmación, a fin de responder a las normas en vigor en este campo.

30 La fase de pre-enriquecimiento/enriquecimiento recurre a medios de cultivo, selectivos o no, bien conocidos por el experto en la materia. Están disponibles comercialmente unos medios de cultivo listo para su uso, frecuentemente en forma líquida, basados en fórmulas de medios tradicionales.

35 La fase de detección se basa en la puesta en evidencia de los caracteres metabólicos de los microorganismos buscados. Se utilizan clásicamente unos sustratos enzimáticos específicos. Estos sustratos enzimáticos están generalmente compuestos de dos partes, una primera parte específica de la actividad enzimática a revelar, denominada también parte diana, y una segunda parte que sirve de marcador, denominada parte marcador, generalmente constituida por un cromóforo o un fluoróforo. Mediante la selección de estos sustratos, según si hay reacción o no, es posible caracterizar la naturaleza de un microorganismo o discriminar diferentes grupos de microorganismos. Así, la aparición o la desaparición de una coloración o de una fluorescencia será la firma de un género o de un tipo de microorganismos. Para ello, la utilización de medios cromógenos permite la detección y la identificación simultáneas de los gérmenes buscados. Esta simplifica el proceso y disminuye sustancialmente el tiempo de obtención del resultado. Se citarán a título de ejemplo concreto los medios ChromID® de la solicitante. Estos medios cromógenos están basados en la detección de caracteres metabólicos específicos de los gérmenes buscados como, por ejemplo, la actividad enzimática beta-glucuronidasa para *Escherichia coli*. Sin embargo, algunos microorganismos, o algunos sub-tipos como por ejemplo *Escherichia coli* O157:H7, no presentan actividad enzimática específica, y no pueden por lo tanto ser detectados con la ayuda de un medio de cultivo cromógeno.

45 La fase de confirmación, por su parte, está más particularmente relacionada con el análisis microbiológico en el campo agroalimenticio. En efecto, cuando el resultado de los métodos desarrollados anteriormente es positivo, es necesario confirmar la presencia del patógeno buscado. Esto impone un ensayo complementario y la utilización de un principio de detección diferente del utilizado durante el primer análisis. Las técnicas de biología molecular, basadas en los caracteres genómicos de los microorganismos buscados, constituyen uno de los medios utilizados para confirmar la identificación. A título de ejemplo, se citarán las técnicas de amplificación clásicas tales como la PCR (Polymerase Chain Reaction) y la NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), que pueden ser acopladas a técnicas de detección en tiempo real conocidas por el experto en la materia.

55 Los inmuno-ensayos constituyen otra de las tecnologías utilizadas para el ensayo de confirmación. Hacen uso de las características inmunógenas de los microorganismos buscados. De manera no exhaustiva, se pueden citar las técnicas ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), por competición o de tipo sándwich, o las técnicas de inmunoaglutinación, detectando unos epitopos de los microorganismos buscados. Estos últimos recurren a unos soportes sólidos funcionalizados, tales como unas perlas (por ejemplo unas partículas de látex) recubiertas de anticuerpos monoclonales o policlonales, siendo dichos soportes funcionalizados puestos en contacto con una muestra biológica, como se indica por ejemplo en las patentes europeas concedidas EP 0 701 624 y EP 1 199 567. Alternativamente, como se describe en la patente US-4,659,658, las partículas sólidas pueden estar recubiertas de lectinas, que se une específicamente a unos azúcares situados en la superficie de un microorganismo dado. El documento US5217715 describe un método que consiste en fijar un receptor hidrocarbonado N-acetilalactosamina-beta-1,4-galactosa-beta-1,4-glucosa sobre un soporte insoluble que puede ser utilizado para la detección de bacterias en un ensayo de aglutinación. En todo caso, la aparición de la aglutinación permite identificar de manera

segura el microorganismo buscado.

5 La identificación completa y precisa de un microorganismo en una muestra necesita por lo tanto el enlace de varias etapas: enriquecimiento, detección, confirmación. La estandarización de los ensayos utilizados rutinariamente ha permitido la automatización de los métodos de detección, que siguen siendo, no obstante, largos de llevar a cabo. Un inconveniente del estado de la técnica es, en efecto, que estas etapas son realizadas de manera secuencial. Otro inconveniente es que la reacción de interacción específica utilizada para la etapa de confirmación, reacción inmunológica o reacción de hibridación molecular es, generalmente, leída en "punto final". Durante este tiempo, en la industria agroalimenticia, la totalidad del lote del producto final está bloqueada esperando el resultado de confirmación, y en términos clínicos, se retrasan el establecimiento de la antibioterapia pertinente y de las medidas de prevención.

15 A la vista del estado de la técnica considerado, falta por lo tanto un procedimiento que combine las etapas de enriquecimiento, de detección y de identificación precisa. Concretamente, tal procedimiento conjugaría rapidez, especificidad y sensibilidad.

La presente invención propone por lo tanto paliar los inconvenientes descritos antes utilizando simultáneamente un cultivo de los microorganismos y al menos una reacción de aglutinación en medio líquido.

20 De manera más precisa, la invención se refiere en primer lugar a un procedimiento de detección y de identificación de al menos un microorganismo susceptible de estar presente en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:

25 a) poner en contacto en un contenedor: un medio de cultivo que permita el crecimiento y/o la detección de los microorganismos, dicha muestra y un soporte sólido sensibilizado;

b) someter el conjunto a una temperatura que favorezca el crecimiento y/o la detección de los microorganismos;

30 c) observar en tiempo real la aparición de una aglutinación que indique la presencia del o de los microorganismos o que confirme dicha presencia cuando dichos microorganismos se detectan en dicho medio de cultivo, al final de la etapa b).

35 Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de detección y de identificación de al menos un microorganismo susceptible de estar presente en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:

a) poner en contacto en un contenedor: un medio de cultivo que permita el crecimiento y/o la identificación de los microorganismos, dicha muestra y un soporte sólido sensibilizado;

40 b) someter el conjunto a una temperatura que favorezca el crecimiento y/o la identificación de los microorganismos;

c) observar en tiempo real la aparición de una aglutinación que permita realizar la identificación del o de los microorganismos o confirmar dicha identificación, cuando el o los citados microorganismos son identificados en dicho medio de cultivo, al final de la etapa b).

45 La invención se refiere también a un procedimiento de detección y de identificación de al menos un microorganismo susceptible de estar presente en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:

50 a) poner en contacto en un contenedor: un medio de cultivo que permita el crecimiento y la identificación de los microorganismos, dicha muestra y un soporte sólido sensibilizado;

b) someter el conjunto a una temperatura que favorezca el crecimiento y/o la identificación de los microorganismos; y

55 d) observar en tiempo real la aparición de una aglutinación que permita completar la identificación del o de los microorganismos, realizada al final de la etapa b).

60 Para completar la identificación, se entiende que aportar una información suplementaria permite precisar la identificación del microorganismo. Por ejemplo, en la etapa a), el medio de cultivo utilizado puede ser específico de las bacterias del género *Escherichia coli* y comprender un sustrato específico de este tipo bacteriano, de manera que la presencia de tales bacterias en la muestra a ensayar se caracteriza por una modificación del medio de cultivo, tal como un cambio de color, si el sustrato utilizado es un sustrato cromógeno. La aglutinación observada en la etapa c) puede, por ejemplo, permitir poner en evidencia una cepa particular del género *Escherichia coli*, tal como *E. coli* O157:H7, que es una cepa enteropatógena.

65 La temperatura que favorece el crecimiento de los microorganismos está comprendida entre 20 y 44°C y la muestra se mantiene a esta temperatura durante un tiempo suficiente para permitir la detección de los microorganismos, es

decir un tiempo comprendido entre 6 y 96 horas.

La utilización combinada de estas diferentes técnicas y en un contenedor único permite al mismo tiempo ganar tiempo y limitar las manipulaciones, y por lo tanto las contaminaciones de los manipuladores o de las muestras, lo que conlleva en este último caso unos falsos positivos. Además, la aplicación de la invención puede ser automatizada. Se señala asimismo que el ahorro de tiempo está relacionado al mismo tiempo con la combinación de dos etapas en una sola y con la detección de la aglutinación en tiempo real y ya no en punto final, como en las técnicas de confirmación mencionadas anteriormente.

Ventajosamente, las etapas a) y c) de los procedimientos descritos anteriormente utilizan unos compuestos cromógenos (también denominados cromóforos) o fluorescentes (también denominados fluoróforos).

Más particularmente, los dos procedimientos de detección y de identificación pueden utilizar preferiblemente la aparición o la desaparición de una coloración o de una fluorescencia. Por otra parte, en todos los procedimientos objetos de la invención, la aglutinación puede ventajosamente ser puesta en evidencia por la aparición o la desaparición de una coloración o de una fluorescencia.

De manera preferida, el contenedor se toma del grupo constituido por las microplacas, las microcúpulas, los microtubos, los capilares o las placas de múltiples pocillos.

Ventajosamente, el procedimiento objeto de la invención puede comprender además una etapa de enumeración de los microorganismos, preferentemente según el método del número más probable explicado en la patente EP 1 105 457 de la solicitante.

Según un modo particular de realización, la reacción de aglutinación llevada a cabo en la etapa c) es una reacción de inmunoaglutinación, que pone en evidencia una reacción antígeno-anticuerpo.

Según otro modo particular de realización, la reacción de aglutinación utilizada en la etapa c) es una reacción de tipo fago-bacteria. Más particularmente, se trata de una reacción entre una proteína recombinante de fago específico de un tipo bacteriano y la molécula bacteriana correspondiente. Tales interacciones se describen en la patente EP 1 198 713.

Según otro modo particular de realización, la reacción de aglutinación llevada a cabo en la etapa c) es una reacción de tipo ligando/antiligando.

Según otro modo particular de realización, la detección en tiempo real de la reacción de aglutinación llevada a cabo en la etapa c) según uno de los modos de realización descritos antes puede permitir una sedimentación antes de la aparición de la aglutinación.

Además, se describe también un kit de diagnóstico que permite llevar a cabo el procedimiento según los diferentes modos de realización desarrollados anteriormente. El kit comprende:

- un contenedor;

- un medio de cultivo selectivo o no, conteniendo o no dicho medio de cultivo un sustrato específico del metabolismo del género de la especie microbiana a detectar; y

- un soporte sólido sensibilizado.

De manera ventajosa, el contenedor se toma del grupo constituido por las microplacas, las microcúpulas, los microtubos, los capilares o las placas de múltiples pocillos.

Según un primer modo de realización preferido, el soporte sensibilizado es un complejo de soporte sólido-antígeno o soporte sólido anticuerpo.

Según un segundo modo de realización preferido, dicho soporte sensibilizado es un complejo soporte sólido-ligando o soporte sólido-antiligando. El ligando puede comprender todo o parte de un bacteriófago.

El kit de diagnóstico según la invención puede comprender además al menos un compuesto cromógeno o fluorescente.

Finalmente, se describe también un último objeto de la invención, que se refiere a la utilización de un kit de diagnóstico para detectar y/o identificar al menos un microorganismo susceptible de estar presente en una muestra.

La invención se entenderá mejor con la lectura de la descripción detallada y de los ejemplos no imitativos siguientes, en combinación con los dibujos, en los que:

- la figura 1 representa una galería de ensayo para la caracterización del origen bacteriano de una mamitis/mastitis, antes de la incubación.

5 - la figura 2 representa la galería de ensayo después de la incubación, con una reacción positiva para *Staphylococcus aureus*.

- la figura 3 representa la galería de ensayo después de la incubación, con una reacción positiva para *Staphylococcus spp.*

10 - la figura 4 representa la galería de ensayo después de la incubación, con una reacción positiva para *Escherichia coli*.

15 - la figura 5 representa la galería de ensayo después de la incubación, con una reacción positiva para *Klebsiella spp.*

El procedimiento objeto de la invención se puede utilizar para unas muestras de origen alimenticio, medioambiental o clínico. La muestra se define como una pequeña parte o pequeña cantidad aislada de una entidad para el análisis.

20 Entre las muestras de origen alimenticio, se puede citar de manera no exhaustiva una muestra de productos lácteos (yogures, quesos etc.), de carne, de pescado, de huevos, de frutos, de verduras, de agua, de bebida (leche, zumo de frutas, soda, etc.). Estas muestras de origen alimenticio pueden también provenir de salsas o de platos elaborados. Una muestra alimenticia puede finalmente proceder de una alimentación destinada a los animales, tales como en particular unas harinas animales.

25 Se mencionarán también las muestras relacionadas con el medioambiente, tales como extracciones de superficie, de agua, de aire.

30 Las muestras de origen clínico pueden corresponder a extracciones de fluidos biológicos (sangre total, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo), de heces, extracciones de la nariz, de la garganta, de la piel, de heridas, de órganos, de tejidos o de células aisladas, etc.

35 El control microbiológico corresponde al análisis de una muestra con el objetivo de aislar y/o identificar y/o enumerar unos microorganismos potencialmente presentes, tales como unas bacterias o unas levaduras. Técnicamente, este análisis comprende el crecimiento *in vitro* de los microorganismos en un medio de cultivo. Por medio de cultivo, se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la supervivencia y/o para el crecimiento de los microorganismos. El medio de cultivo puede contener eventuales aditivos, como por ejemplo: peptonas, uno o varios factores de crecimiento, hidratos de carbono, uno o varios agentes selectivos, tampones, uno o varios gelificantes, etc. Este medio de cultivo puede presentarse en forma de líquido, de gel listo para el uso, es decir listo para la siembra en un tubo, frasco o sobre caja de Petri.

40 En el sentido de la presente invención, el término microorganismo abarca las bacterias gram positivas o gram negativas, las levaduras y más generalmente los organismos unicelulares, invisibles a simple vista, que pueden ser manipulados y multiplicados en laboratorio.

45 De manera general, el medio de cultivo puede además contener un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática o metabólica de los microorganismos diana gracias a una señal detectable directa o indirectamente. Para una detección directa, este sustrato puede ser unido a una parte que actúa como marcador, fluorescente o cromógeno. Para una detección indirecta, el medio de cultivo según la invención puede comprender además un indicador de pH, sensible a la variación de pH inducida por el consumo del sustrato y que revela el crecimiento de los microorganismos diana. Dicho indicador de pH puede ser un cromóforo o un fluoróforo. Se citarán como ejemplos de cromóforos el rojo neutro, el azul anilina, el azul de bromocresol. Los fluoróforos comprenden por ejemplo la 4-metilumbeliferona, los derivados del aminocumarina o los derivados de la resorufina.

50 En el sentido de la presente invención, se debe confirmar la identificación del microorganismo buscado, potencialmente efectuada mediante la búsqueda de sus caracteres metabólicos. Esta confirmación puede recurrir a reacciones de aglutinación.

55 Por aglutinación, se entiende el resultado de una interacción entre unos microorganismos y unas partículas, siendo dichas partículas bien de origen natural, tales como inmunoglobulinas de tipo M, o bien de tipo soporte sólido, tales como polímeros. Por esta interacción, microorganismos y partículas se agregan, se adhieren entre sí y forman una red. Dicha red es susceptible de sedimentar o precipitar. La interacción entre los microorganismos y las partículas puede conllevar una sedimentación previa, que la observación en tiempo real permitirá detectar antes de la formación completa de la red. Las reacciones de aglutinación comprenden unas reacciones inmunológicas, tales como las reacciones antígeno-anticuerpo o más generalmente unas interacciones específicas entre proteínas. La red o complejo formado por dicha reacción específica se detecta entonces bien visualmente, o bien de manera automática gracias a un sistema óptico. Alternativamente, se puede determinar la cantidad de complejo formado.

Se puede utilizar cualquiera de los diferentes métodos conocidos por el experto en la técnica para efectuar una reacción de aglutinación. El soporte sólido se selecciona entre los materiales naturales, los materiales de síntesis modificados o no químicamente, y en particular entre los látex, los polímeros de tipo policloruro de vinilo, polietileno, poliestireno, poliacrilato y los copolímeros de tipo de aquellos a base de estireno. Tal soporte sólido puede estar en forma de partículas.

Por "soporte sensibilizado" se entiende la fijación sobre dicho soporte sólido de compuestos funcionales que comprenden unos antígenos, unos anticuerpos, unos fagos enteros o unas proteínas de fagos.

El término antígeno designa un compuesto susceptible de ser reconocido por un anticuerpo del cual indujo la síntesis mediante una respuesta inmune.

El término anticuerpo incluye los anticuerpos policlonales o monoclonales, los anticuerpos obtenidos por recombinación genética y unos fragmentos de anticuerpos.

Los fagos, o bacteriofagos, son unos virus que infectan sólo unas bacterias; son asimismo denominados virus bacterianos. En las reacciones de aglutinaciones, se utilizan para sus proteínas, que reconocen una cepa o una especie bacteriana dada con una gran especificidad y una gran sensibilidad.

La fijación sobre un soporte sólido puede corresponder a una inmovilización directa o indirecta: por inmovilización directa, se entiende la fijación por covalencia o adsorción pasiva; una inmovilización directa puede efectuarse mediante un ligando fijado químicamente sobre dicho soporte sólido; por inmovilización indirecta, se entiende la interacción ligando/antiligando entre un ligando fijado sobre el antígeno, el anticuerpo o el fago (más ampliamente, el compuesto funcional) y el antiligando o ligando complementario fijado sobre el soporte sólido.

Las parejas ligando/antiligando son bien conocidas por el experto en la materia, y se pueden citar por ejemplo las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido. También puede ser utilizado para inmovilizar una molécula biológica un compuesto hidrosoluble derivado de un homopolímero o copolímero de anhídrido maleico, tales como los desarrollados por la solicitante en la patente EP 0 561 722. Estos soportes sólidos pueden ser distribuidos en la reacción en diferentes formas: liofilizada, en suspensión líquida, en forma de perla, tal como las disponibles comercialmente bajo la marca BioBall®, etc. La aglutinación puede ser detectada visualmente, o mediante un lector óptico automático, según diferentes principios conocidos por el experto en la materia entre los cuales se citará, de manera no exhaustiva:

(1) la detección de la aparición de una fluorescencia, por sedimentación de un látex teñido que absorbe la fluorescencia inicialmente presente en el medio;

(2) la detección de un cambio de color por mezcla de partículas de látex coloreadas con la matriz potencialmente coloreada;

(3) la concentración de fluorescencia por aglutinación de las partículas de látex fluorescentes, que conlleva una desaparición de la fluorescencia difusa en el medio;

(4) la desaparición de color por sedimentación de un látex coloreado presente en el medio.

Los fluoróforos utilizables se han mencionado anteriormente y comprenden la 4-metilumbeliferona, los derivados del aminocumarina o los derivados de la resorufina.

Las operaciones de cultivo/identificación y después aglutinación en punto final descritas en dos etapas son, según la presente invención, combinadas en una sola etapa, siendo la aglutinación específica detectada en tiempo real. A título de ilustración, se citará la identificación posible en una muestra de origen alimenticio de *Listeria monocytogenes*, serotipo 4b; la detección de *Listeria monocytogenes* se puede efectuar con la ayuda de un medio de cultivo que contiene uno o más sustratos específicos del metabolismo de esta bacteria y la identificación del serotipo 4b se efectuará simultáneamente mediante la reacción de aglutinación, detectada en tiempo real.

En un modo de realización particular, la invención se puede llevar a cabo en contenedores tales como microplacas, microcúpulas, microtubos, capilares, etc.

Ventajosamente, el procedimiento según la invención puede estar asociado a un dispositivo automático de control microbiológico de tipo TEMPO®, tal como el desarrollado por la solicitante y puede, facultativamente, permitir una enumeración de los microorganismos detectados.

El procedimiento, objeto de la invención, puede llevarse a cabo con la ayuda de un kit que comprende: un medio de reacción que contiene una base nutritiva, unas partículas sensibilizadas y eventualmente un sustrato cromógeno

específico del o de los microorganismos buscados. Dicho medio se resuspende con una parte alícuota de la muestra a analizar. Ventajosamente, el kit que permite llevar a cabo el procedimiento según la invención puede también contener un contenedor sólido de tipo microplaca, microtubo, microcúpula, capilar, tarjeta VITEK® o tarjeta TEMPO®.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Doble numeración *Escherichia coli* spp y *Escherichia coli* O157 asociando reacciones fenotípicas e inmunológicas

10 El objetivo de este análisis es realizar la numeración simultánea de *E. coli* spp por vía enzimática y de *E. coli* O157 por vía inmunológica utilizando el sistema TEMPO® comercializado por la solicitante.

Modo de realización:

15 Etapa 1: resuspensión del medio de reacción por una parte alícuota de la muestra a analizar:

El medio de reacción contiene:

20 - un sustrato enzimático específico de la especie *E. coli*: 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronido (Biosynth ref. M-5700): no fluorescente a T0) a 50 mg/l (puede variar entre 0,1 mg/l y 1000 mg/l);

- partículas de látex (Oxoid, ref. DR0620M), teñidas de azul, sensibilizadas con unos anticuerpos específicos de *E. coli* O157 al 1% de extracto seco (puede variar entre el 0,1 y el 10%);

25 - una base nutritiva: peptonas a la concentración de 10 g/l;

- un sistema inhibitor: sales biliares a la concentración de 1,5 g/l.

30 El medio de reacción resuspendido en la muestra (por ejemplo 4 ml de agua de la red de distribución) se incorpora después en una tarjeta TEMPO® para realizar una numeración.

Antes de la incubación de la tarjeta, los pocillos de esta última son azules y no fluorescentes.

35 Etapa 2: incubación de la tarjeta:

Las tarjetas TEMPO® son después incubadas a 37°C durante 24h. Durante este periodo de incubación, la reacción de aglutinación de las partículas sensibilizadas con unos anticuerpos anti-*E. coli* O157 y la reacción enzimática (degradación del sustrato específico de *E. coli*) se efectúan simultáneamente al crecimiento bacteriano, en caso de presencia de las bacterias diana en los pocillos de la tarjeta TEMPO®.

40 Etapa 3: lectura del ensayo después de 24h de incubación:

45 Reacciones positivas para *E. coli* O157, hay formación del complejo anticuerpo anti-*E. coli* O157-células de *E. coli* O157 que se traduce por la aglutinación de las partículas de látex y por lo tanto una desaparición de la coloración azul, consecutiva a la formación de un precipitado azul en el fondo de los pocillos en cuestión.

Reacción positiva para *E. coli* spp: aparición de fluorescencia (liberación de moléculas fluorescentes de 4-metilumbeliferona) en el o los pocillos después de la degradación del sustrato por *E. coli* spp.

50 Pocillos positivos para *E. coli* spp y negativo para *E. coli* O157: fluorescentes y azules

Pocillos positivos para *E. coli* spp y *E. coli* O157: fluorescentes y no coloreados (+ precipitado azul en el fondo del pocillo)

55 Pocillo negativo para *E. coli* spp y *E. coli* O157: no fluorescentes y azules

Los pocillos positivos *E. coli* O157 y *E. coli* spp son después contabilizados para determinar por medio de la tabla NPP (algoritmo interno) el número de unidades que forman unas colonias (UFC) de *E. coli* O157 y *E. coli* spp por gramo de muestra.

60 Ejemplo 2: Caracterización del origen bacteriano de una mamitis/mastitis en los bovinos/ovinos/caprinos lecheros para adoptar un tratamiento antibiótico apropiado y eficaz

65 La mamitis resulta de una infección de la mama por unas bacterias más o menos adaptadas a este biotopo. Varias bacterias son responsables de este tipo de infección y son clasificadas en dos grupos: las bacterias de los depósitos mamarios (por ejemplo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp) y las bacterias del medioambiente (por ejemplo

Escherichia coli, *Klebsiella spp*).

Principio del ensayo: caracterización del origen bacteriano de una mamitis por aglutinación de partículas sensibilizadas, en suspensión en un medio líquido, con las células bacterianas diana (es decir *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*).

Modo de realización:

Etapa 1: resuspensión del medio de reacción por una parte alícuota de la muestra a analizar (por ejemplo leche):

El ensayo se presenta en forma de una galería que comprende 4 pocillos que contienen el medio de reacción.

La composición del medio de reacción es la siguiente:

- unas partículas azules sensibilizadas con unas proteínas de fagos y/o unos anticuerpos (Ac) específicos de las dianas: *Staphylococcus aureus* (pocillo nº 1), *Streptococcus spp* (pocillo nº 2), *Escherichia coli* (pocillo nº 3), *Klebsiella spp* (pocillo nº 4);

- una base nutritiva: agua peptonada tamponada (ref. bMx 51094)

Cada pocillo se resuspende con 500 µl de muestra.

El estado inicial de la galería antes de la incubación (ausencia de reacción): todos los pocillos de la galería son azules, debido a la ausencia de aglutinación y de sedimentación a T0 de las partículas azules sensibilizadas anti-diana (véase la figura 1).

Etapa 2: incubación de la galería:

La galería se incuba después a 37°C durante 4 a 16h. Durante este periodo de incubación, la reacción de aglutinación de las partículas sensibilizadas antidiana se efectúa simultáneamente al crecimiento bacteriano, en caso de contaminación del pocillo por la bacteria diana responsable de la mamitis investigada.

Etapa 3: lectura del ensayo después de 4 a 16h de incubación:

Reacción positiva: formación del complejo proteína de fago/bacteria o anticuerpo/antígeno bacteriano que se traduce por la aglutinación de las partículas de látex (formación de un precipitado en el fondo del pocillo) y por lo tanto una desaparición de la coloración azul en los pocillos en cuestión. Se pueden considerar diferentes casos:

- en el caso en el que la mamitis se debe a *Staphylococcus aureus*, la desaparición de la coloración azul se produce en el pocillo nº 1 (véase la figura 2),

- en el caso en el que la mamitis se debe a *Streptococcus spp*, la desaparición de la coloración azul se produce en el pocillo nº 2 (véase la figura 3),

- en el caso en el que la mamitis se debe a *Escherichia coli*, la desaparición de la coloración azul se produce en el pocillo nº 3 (véase la figura 4),

- en el caso en el que la mamitis se debe a *Klebsiella spp*, la desaparición de la coloración azul se produce en el pocillo nº 4 (véase la figura 5).

Ejemplo 3: numeración de *Salmonella* en la plataforma TEMPO®

El objetivo de este análisis es enumerar las *Salmonella* por vía inmunológica por aglutinación de partículas sensibilizadas con unas proteínas recombinantes de fagos, utilizando el sistema TEMPO® comercializado por la solicitante.

Modo de realización:

Etapa 1: adsorción de las proteínas de fago anti *Salmonella* B D1

Esta etapa consiste en adsorber las proteínas de fago en la superficie de las partículas:

- referencia: proteínas de fago anti B-D1 2,67 mg/ml

- látex utilizado, proporcionado por Polymer Laboratories: Plain fluorescent yellow PL FY lote CD 222:311 nm

ES 2 529 055 T3

Las proteínas de fago son adsorbidas a la concentración de 140 µg/ml en tampón fosfato de 20 mM pH 7,2. El volumen del ensayo es de 200 µl. Las partículas de látex son introducidas a razón de 5 mg/ml en el medio.

La adsorción se realiza bajo agitación en una rueda giratoria durante 15 horas.

5

Control del rendimiento de adsorción:

- centrifugación de 50 µl de muestra y recuperación del sobrenadante;

10

- ensayo del sobrenadante mediante el método BCA de ensayo de las proteínas;

- rendimiento calculado con respecto a la curva estándar y con respecto a la concentración inicial de la proteína de fago utilizado para el ensayo.

15

Este rendimiento es del 73%

El tamaño de las partículas se mide con el granulómetro.

Es de 311 nm para el látex PL FY y de 315 nm para los conjugados partículas-proteínas de fago.

20

Etapa 2: incubación en la tarjeta TEMPO®:

El medio de reacción contiene:

25

- 3,5 ml de base nutritiva: peptonas a la concentración de 10 g/l

- una muestra que contiene 50 UFC de bacterias *Salmonella bareilly* 06.03.927 IM1272;C₁

30

- 0,5 ml de partículas de látex fluorescentes, sensibilizadas con unas proteínas de fago específicas de *Salmonella* al 0,5% de extracto seco;

El medio de reacción se incorpora después en una tarjeta TEMPO® para realizar una enumeración.

Antes de la incubación de la tarjeta, los pocillos de esta última son fluorescentes.

35

Las tarjetas TEMPO® son después incubadas a 37°C durante 24h. Durante este periodo de incubación, la reacción de aglutinación de las partículas sensibilizadas con las proteínas de fago anti-B-D1 se efectúa simultáneamente al crecimiento bacteriano, en caso de presencia de las bacterias diana en los pocillos de la tarjeta TEMPO®.

40

Etapa 3: lectura del ensayo después de 24h de incubación:

Reacción positiva para *Salmonella bareilly*, hay formación del complejo proteínas de fago-células de *Salmonella bareilly* que se traduce por la aglutinación y la sedimentación de las partículas de látex. Por lo tanto, se observa una concentración de la fluorescencia en el fondo de los pocillos en cuestión y una desaparición de la fluorescencia a nivel de la ventana de lectura.

45

Reacción negativa: la fluorescencia sigue homogénea en todo el pocillo.

Los pocillos positivos son después contabilizados para determinar por medio de la tabla NPP (algoritmo interno) el número de unidades que forma colonias (UFC) de *Salmonella bareilly* 06.03.927 IM1272;C₁ por gramo de muestra.

50

El resultado de enumeración es de 11 UFC/ml, es decir 44 UFC introducidas, en acuerdo con los 50 UFC teóricos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de detección en un contenedor de al menos un microorganismo susceptible de estar presente en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:
- 10 a) poner en contacto en dicho contenedor: un medio de cultivo que permita el crecimiento y/o la detección de los microorganismos, dicha muestra y un soporte sólido sensibilizado;
- 15 b) someter el conjunto a una temperatura que favorezca el crecimiento y/o la detección de los microorganismos; y
- c) observar en tiempo real, en el interior de dicho contenedor y simultáneamente al crecimiento del o de los microorganismos, la aparición de una aglutinación que indique la presencia del o de los microorganismos o que confirme dicha presencia cuando dichos microorganismos son detectados en dicho medio de cultivo, al final de la etapa b).
- 20 2. Procedimiento de detección y de identificación en un contenedor de al menos un microorganismo susceptible de estar presente en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:
- 25 a) poner en contacto en dicho contenedor: un medio de cultivo que permita el crecimiento y/o la identificación de los microorganismos, dicha muestra y un soporte sólido sensibilizado;
- 30 b) someter el conjunto a una temperatura que favorezca el crecimiento y/o la identificación de los microorganismos; y
- 35 c) observar en tiempo real, en el interior de dicho contenedor y simultáneamente al crecimiento del o de los microorganismos, la aparición de una aglutinación que permita realizar la identificación del o de los microorganismos o que confirme dicha identificación, cuando dicho o dichos microorganismos son identificados en dicho medio de cultivo, al final de la etapa b).
- 40 3. Procedimiento de detección y de identificación en un contenedor único de al menos un microorganismo susceptible de estar presente en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:
- 45 a) poner en contacto en un contenedor: un medio de cultivo que permita el crecimiento y la identificación de los microorganismos, dicha muestra y un soporte sólido sensibilizado;
- 50 b) someter el conjunto a una temperatura que favorezca el crecimiento y la identificación de los microorganismos; y
- 55 c) observar en tiempo real, en el interior de dicho contenedor y simultáneamente al crecimiento del o de los microorganismos, la aparición de una aglutinación que permita completar la identificación del o de los microorganismos, realizada al final de la etapa b).
- 60 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección o la identificación en el medio de cultivo utiliza la aparición o la desaparición de una coloración o de una fluorescencia.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la aglutinación se pone en evidencia por la aparición o la desaparición de una coloración o de una fluorescencia.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el contenedor se toma del grupo constituido por las microplacas, las microcúpulas, los microtubos, los capilares o las placas de múltiples pocillos.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de enumeración de los microorganismos.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción de aglutinación aplica una reacción antígeno-anticuerpo.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la reacción de aglutinación aplica una reacción de tipo fago-proteína bacteriana.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la reacción de aglutinación aplica una reacción de tipo ligando/antiligando.

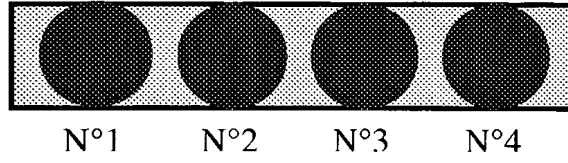


Fig. 1

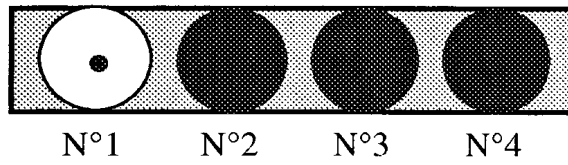


Fig. 2

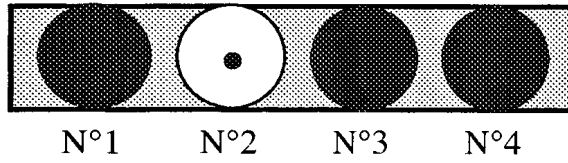


Fig. 3

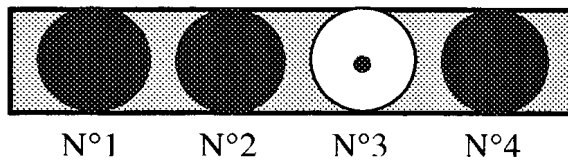


Fig. 4

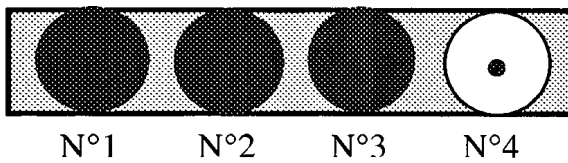


Fig. 5