

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 836**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/02** (2006.01)

**G01R 27/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2007 E 07861206 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 1981983**

54 Título: **Método y composición para un test rápido de viabilidad celular**

30 Prioridad:

**12.01.2006 US 758362 P**

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

**18.05.2015**

73 Titular/es:

**BIOSENSE TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)  
4 ARROW DRIVE  
WOBURN, MA 01801, US**

72 Inventor/es:

**RIEDER, RONALD J. y  
ZAVIZION, BORIS A.**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

**ES 2 535 836 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método y composición para un test rápido de viabilidad celular

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La contaminación e infección microbiana es uno de los mayores retos para la supervivencia y el bienestar de humanos y animales y, como tal, sigue consumiendo una enorme cantidad de recursos sociales. Un componente esencial del esfuerzo para combatir patógenos es evaluar la presencia y viabilidad de células procariotas y eucariotas. La mayor parte de los métodos comerciales capaces de evaluar la viabilidad celular se basan normalmente en el crecimiento celular para su determinación. Sin embargo, una limitación continua de estos métodos convencionales radica en la dependencia del tiempo necesario para multiplicar por dos la población celular y en la disponibilidad práctica de las condiciones de cultivo apropiadas. En especial en caso de células de crecimiento lento, los métodos basados en el crecimiento biológico para detectar cambios observables pueden requerir un tiempo considerable. Por consiguiente, los métodos existentes pueden ser ineficaces para aplicaciones en las que los retrasos se traducen en costes económicos y, en casos extremos, en vidas humanas. Incluso cuando los métodos de detección existentes son suficientes, una detección más rápida podría aumentar la eficiencia y reducir los costes.

20 El aumento de la resistencia de patógenos a los antibióticos ha conducido a un problema de salud pública mundial que se manifiesta en infecciones intratables en la población humana en general y en granjas. Aunque el problema es complejo, se sabe que el uso creciente de antibióticos ha creado presiones evolutivas selectivas con las que muchas especies de bacterias y protozoos infecciosos han desarrollado mecanismos de resistencia, haciendo que los antibióticos usuales recetados para tratar enfermedades ya no sean efectivos, lo que ha conducido a la propagación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos.

25 La mayoría de los métodos existentes para determinar la susceptibilidad de un patógeno a los antibióticos se basa también en la detección del crecimiento y depende exclusivamente del aumento de la biomasa debido a la división celular continua del patógeno en cultivo. Los métodos estándar de disposición en placas pueden requerir muchos días, o incluso semanas en caso de patógenos de crecimiento lento, para producir resultados de susceptibilidad a los fármacos. Los métodos de detección óptica, aunque requieren menos tiempo, siguen precisando de un tiempo significativo para que las células se desarrollen hasta un nivel detectable. Los retrasos en la obtención de resultados de las pruebas de susceptibilidad han conducido a la práctica clínica de prescribir empíricamente terapias para el tratamiento de infecciones con peligro para la vida. La incapacidad para identificar oportunamente células resistentes a compuestos antimicrobianos conduce a prescribir terapias inapropiadas y, en consecuencia, a resultados desfavorables para el paciente. La aparición continua de cepas resistentes a los fármacos representa una amenaza a nuestra capacidad para tratar infecciones con peligro para la vida debido al uso creciente de fármacos ineficaces.

35 Existe una necesidad permanente de reducir el uso indiscriminado y no esencial de antibióticos con el fin de mejorar significativamente el pronóstico de los pacientes y también para reducir la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos. Esta invención proporciona un método para identificar rápidamente patógenos resistentes a los antibióticos, reduciendo así la cantidad de antibióticos recetados innecesariamente.

40 La capacidad para detectar rápidamente y de forma fiable la presencia de células nocivas es importante para el uso seguro de numerosos productos médicos e industriales y para la puesta en práctica segura y eficiente de procedimientos médicos y procesos industriales. La rápida determinación de la calidad del agua durante situaciones de emergencia, como inundaciones y terremotos, el diagnóstico inmediato de pacientes con traumatismos, la selección de materias primas/equipos de proceso en la industria alimentaria, el control de calidad durante las fases de fabricación farmacéutica y el control de biología y procesos de fermentación son sólo algunos ejemplos de las aplicaciones de esta invención.

45 Otro problema permanente está relacionado con el hecho de que la vida útil en almacenamiento de una unidad de plaquetas, un producto sanguíneo transfundido para controlar una hemorragia, es de solo cinco días. Para conservar su función fisiológica, las plaquetas deben almacenarse a temperatura ambiente. Estas condiciones son favorables para el crecimiento de muchas especies de bacterias contaminantes en las unidades almacenadas. Si no se detecta, este crecimiento podría conducir a infecciones post-transfusión y reacciones sépticas. Los métodos actualmente utilizados para la esterilidad de estos productos requieren un tiempo de 48 horas en el caso de las células de crecimiento rápido y considerablemente mayor para las células de crecimiento lento, hasta que las éstas se desarrollen a niveles detectables. Por consiguiente, la durabilidad efectiva de una unidad de plaquetas se reduce a únicamente tres días. Un método más rápido para identificar el crecimiento de bacterias contaminantes de crecimiento rápido y de crecimiento lento en plaquetas aumentaría la vida útil de las plaquetas y pondría menos presión en un recurso ya precioso.

55 La meningitis bacteriana es una infección que provoca inflamación de las meninges. Para reconocer enfermedades bacterianas en las que una demora en el comienzo del tratamiento puede representar un peligro para la vida, es esencial un diagnóstico rápido y eficaz. Un fallo en el diagnóstico y tratamiento temprano de la meningitis bacteriana

5 puede resultar en una morbilidad con complicaciones graves a largo plazo, incluyendo lesiones cerebrales, pérdida de audición, discapacidad intelectual y muerte. Cuando un paciente presenta síntomas de infección, el médico puede recetar un antibiótico para una infección bacteriana potencial antes de comenzar cualquier prueba. Existe un problema permanente relacionado con el hecho de que los métodos actualmente disponibles no permiten un cultivo eficaz de bacterias en líquido cefalorraquídeo obtenido de pacientes "previamente tratados", dificultando así la confirmación del diagnóstico bacteriano usando métodos de detección de crecimiento. La rapidez y fiabilidad en la detección del patógeno y la determinación de la susceptibilidad del patógeno a un medicamento son de suma importancia.

10 Un método desarrollado y utilizado para detectar con mayor rapidez la presencia de células viables consiste en la detección de la impedancia de muestras biológicas, que mide desviaciones metabólicas para controlar la proliferación celular y el crecimiento subsiguiente de la población. Históricamente, la detección de la impedancia se ha utilizado como un análogo electrónico de las placas de Petri para controlar la proliferación celular y el crecimiento subsiguiente de la población. Los sistemas comerciales que utilizan este método normalmente miden la conductancia, la capacitancia, el vector de impedancia completo, es decir, los dos componentes resistivos y reactivos, y utilizan geometrías con umbrales de detección que requieren el desarrollo de un millón de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro ( $10^6$  CFU/ml) o más en el caso de las bacterias. Sin embargo, la obtención de un título tan alto requiere un tiempo considerable, en especial si las bacterias pertenecen a una especie de crecimiento lento.

20 En Caide Xiao, John H.T. Luong: "Assessment of cytotoxicity by emerging impedance spectroscopy", Toxicology and Applied Pharmacology 206 (2005) 102-112, se desarrolla una técnica en línea y en continuo basada en la detección de la impedancia eléctrica de sustratos celulares para medir la concentración y la función de respuesta temporal de células V79 fibroblásticas expuestas a tóxicos.

25 En McCoy; Wang M H; E: "Use of electric cell-substrate impedance sensing as a tool for quantifying cytopathic effect in influenza A virus infected MDCK cells in real-time", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, 20051201 Elsevier BV, NL - ISSN 0166-0934, se ilustra el uso de la detección de impedancia eléctrica de sustratos celulares (ECIS) para controlar el progreso del CPE debido a infección por el virus de la gripe A.

30 El documento US 2002/0086277 A1 describe un método para determinar la eficacia de un compuesto en el tratamiento de un sujeto infectado por un microbio, o un método para determinar la concentración mínima inhibidora de un agente antimicrobiano contra un microbio, incluyendo dicho método la medición de un parámetro eléctrico de un cultivo microbiano.

El documento US 6.051.422 A describe un aparato y un método para controlar células y un método para controlar cambios celulares después de la adición de un analito al entorno celular, que comprenden un dispositivo que incluye una matriz de microelectrodos dispuestos en una cámara de cultivo celular, adhiriéndose parte de las células de esta matriz a las superficies de los microelectrodos.

35 El documento EP 1 764 417 A1 describe un método y un aparato para medir eléctricamente efectos adversos de sustancias tóxicas en células procariotas, que incluye medir un cambio intracelular completo provocado por la presencia de sustancias tóxicas como un cambio en una señal eléctrica de las membranas celulares de las células procariotas.

40 Así, existe una necesidad de métodos nuevos, rápidos y mejorados para detectar células viables y determinar su susceptibilidad a un agente externo o factor medioambiental. La presente invención satisface esta necesidad. Diversas realizaciones de esta invención proporcionan métodos que dan resultados de ensayo de forma considerablemente más rápida que los métodos convencionales basados en el crecimiento o el aumento de la biomasa.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

45 Los inventores de la materia descrita han descubierto ahora un método para controlar una respuesta de estrés de una célula utilizando una detección de impedancia para obtener esta información. El cambio en la impedancia de una suspensión celular provocado por la respuesta de estrés de organismos vivos a un estresor es inmediato y más intenso que el cambio en la impedancia de una suspensión celular resultante del crecimiento. El método aquí descrito controla directamente cambios en el nivel de respuesta de estrés inducida por diferentes estresores mediante la detección de cambios en la impedancia de una suspensión celular. A partir de estos cambios se puede deducir la presencia o ausencia de células viables y la susceptibilidad de las células a diferentes estresores. La invención incluye, entre otros, los siguientes aspectos, individualmente o en combinación.

55 En una realización, la invención se refiere a un método para controlar rápidamente una respuesta de estrés de una célula suspendida en un medio a un estresor y determinar la magnitud de la respuesta de estrés, comprendiendo dicho método: a) bajo condiciones adecuadas para controlar la tensión y/o la corriente, aplicar un campo eléctrico a una muestra de ensayo que comprende la célula suspendida en el medio o a una muestra de ensayo que

comprende la célula en una perla de microcultivo suspendida; b) controlar la tensión y/o la corriente; c) permitir que un estresor afecte a la muestra de ensayo, eligiéndose el estresor entre un estresor aplicado antes de la aplicación del campo eléctrico, un estresor aplicado esencialmente de forma simultánea con dicha aplicación del campo eléctrico y un estresor aplicado después de la misma; d) controlar una respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo, consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en un cambio de impedancia de la muestra de ensayo durante el período de transición desde una primera medida de la impedancia de la muestra de ensayo aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento, controlando así la respuesta de estrés de dicha célula al estresor; y e) determinar el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo, siendo el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo una indicación de la magnitud de la respuesta de estrés de la célula, determinándose la magnitud de la respuesta de estrés de la célula al estresor; comprendiendo dicho método adicionalmente: comparar matemáticamente el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinado en el paso (e) con: (i) un primer valor estándar que representa la respuesta de impedancia de una primera muestra de referencia que incluye el medio con o sin el estresor, donde la primera muestra de referencia no incluye células; y/o (ii) un segundo valor estándar que representa la respuesta de impedancia inicial de una segunda muestra de referencia que incluye una célula y el medio, siendo la célula de la muestra de referencia del mismo tipo y estando presente en la misma concentración que la célula de la muestra de ensayo, y estando la muestra de referencia desprovista del estresor; y determinar un valor para un Primer Perfil de Respuesta de Impedancia de la muestra de ensayo, estando basado el valor del Primer Perfil de Respuesta de Impedancia en la comparación matemática del nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinado en el paso (e) con el primer valor estándar y/o el segundo valor estándar, y determinándose la respuesta de impedancia inicial mediante un control dentro de un período de aproximadamente 45 minutos desde la primera medida de impedancia.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar rápidamente la presencia o ausencia de una célula mediante el control de una respuesta de estrés de la célula si ésta está presente, o la ausencia de la respuesta de estrés si dicha célula no está presente o está muerta, comprendiendo dicho método: a) bajo condiciones adecuadas para controlar la tensión y/o la corriente, aplicar un campo eléctrico a una muestra de ensayo que comprende la célula suspendida en un medio o a una muestra de ensayo que comprende la célula sobre una perla de microcultivo suspendida; b) controlar la tensión y/o la corriente; c) permitir que un estresor afecte a la muestra de ensayo, eligiéndose el estresor entre un estresor aplicado antes de la aplicación del campo eléctrico, un estresor aplicado esencialmente de forma simultánea con dicha aplicación del campo eléctrico y un estresor aplicado después de la misma; d) en un momento específico o a lo largo de una serie de momentos, medir una respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo, consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en un cambio de impedancia de la muestra de ensayo durante el período de transición desde una primera medida de la impedancia de la muestra de ensayo aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento; y e) evaluar el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en cada momento, siendo el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en cada momento una indicación del nivel de la respuesta de estrés de dicha célula, con lo que se controla la respuesta de estrés de dicha célula al estresor si dicha célula está presente en la muestra de ensayo, o la ausencia de la respuesta de estrés si dicha célula no está presente en la muestra de ensayo o si está muerta; y de este modo detectar rápidamente la presencia o ausencia de dicha célula en la muestra de ensayo; comprendiendo dicho método adicionalmente confirmar la presencia o ausencia de dicha célula en la muestra de ensayo mediante: (i) medir una respuesta de impedancia de una primera muestra de referencia que incluye el medio con o sin el estresor, donde la primera muestra de referencia no incluye células; y/o (ii) medir una respuesta de impedancia inicial de una segunda muestra de referencia que incluye dicha célula y el medio, estando dicha célula en la misma concentración que la célula en la muestra de ensayo, y estando la segunda muestra de referencia desprovista del estresor; y consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de referencia en un cambio de impedancia de la segunda muestra de referencia durante el período de transición desde una primera medida de la impedancia de la segunda muestra de referencia aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento; (iii) determinar un valor para un Perfil de Respuesta de Impedancia mediante la comparación de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo obtenida en el paso (d) con la respuesta de impedancia de la primera muestra de referencia y/o la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de referencia; y (iv) evaluar la comparación del paso (iii), confirmando de este modo la presencia o ausencia de dicha célula en la muestra de ensayo, determinándose la respuesta de impedancia inicial mediante un control dentro de un período de aproximadamente 45 minutos desde la primera medida de impedancia.

Otra realización de la invención consiste en un método para determinar un resultado predictivo de la susceptibilidad de una célula suspendida en un medio a una concentración seleccionada de un agente bioactivo y un nivel de estrés de la célula con la concentración seleccionada del agente bioactivo, siendo el nivel de susceptibilidad de la célula previamente conocido o desconocido, comprendiendo dicho método: a) i) en momentos específicos o a lo largo de una serie de momentos, medir una respuesta de impedancia inicial de una muestra de ensayo que incluye: la célula suspendida en un medio o de una muestra de ensayo que incluye la célula sobre una perla de microcultivo suspendida, y la concentración seleccionada del agente bioactivo; y medir una respuesta de impedancia de una

- muestra de referencia que incluye el medio y la concentración seleccionada del agente bioactivo, estando dicha muestra de referencia desprovista de células, y midiéndose la respuesta de impedancia inicial dentro de un período de aproximadamente 45 minutos de los minutos iniciales de la medición; ii) determinar un Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia en cada uno de los momentos, consistiendo el Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia en una comparación matemática de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinada en el paso a)(i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso a)(i) en cada momento; iii) opcionalmente, repetir los pasos a)(i) y a)(ii) para múltiples concentraciones seleccionadas del agente bioactivo con el fin de obtener el Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia correspondiente para cada concentración diferente seleccionada del agente bioactivo conocido; b) i) en momentos específicos o a lo largo de una serie de momentos, medir la respuesta de impedancia inicial de una segunda muestra de ensayo que incluye la célula suspendida en el medio o que incluye la célula sobre una perla de microcultivo suspendida, estando la segunda muestra de ensayo desprovista del agente bioactivo; y medir la respuesta de impedancia de una muestra de referencia que incluye la célula suspendida en el medio o que incluye la célula sobre una perla de microcultivo suspendida, estando dicha muestra de referencia desprovista de células; ii) calcular un Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia en una comparación matemática de la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de ensayo determinada en el paso b) i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso b) i) en cada momento; y c) para cada concentración seleccionada del agente bioactivo, determinar un valor de Respuesta de Impedancia Normalizada, NIR, consistiendo la NIR en un valor numérico determinado mediante un algoritmo que relaciona el valor del Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia obtenido en el paso a) ii), y/o en el paso a) iii), con el valor del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia obtenido en el paso b) ii), de modo que el valor del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia se incorpora en la NIR, y consistiendo el valor NIR determinado en una medida cuantitativa del nivel de estrés de la célula a la concentración seleccionada del agente bioactivo.
- 25 Aquí también se describen kits (no reivindicados) que comprenden materiales que son útiles o necesarios para llevar a cabo un método de la invención, y un conjunto de instrucciones para la utilización del kit.

Los métodos de acuerdo con diversas realizaciones de la invención facilitan la detección rápida y fiable de células, la identificación de patógenos y la determinación de la susceptibilidad de un patógeno frente a un fármaco particular.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 30 Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la invención se evidenciarán de la siguiente descripción más particular de realizaciones ilustrativas de la invención, tal como se ilustran en las figuras adjuntas, donde los caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes en todas las vistas diferentes. Las figuras no están necesariamente a escala. En su lugar, se hace hincapié en ilustrar los principios de la invención.
- 35 Fig. 1: diagrama esquemático de un concepto de casete, mostrando un casete basado en una geometría plana.
- Fig. 2: diagrama esquemático que representa un sistema de detección de control de impedancia.
- Fig. 3: gráfico que representa la respuesta de impedancia de *Escherichia coli* (*E. coli*) no sometida a shock (curva superior), y la respuesta de impedancia inicial de *E. coli* sometida a shock térmico (curva inferior) en un medio de caldo de tripticasa-soja (TSB) a 37°C.
- 40 Fig. 4: descripción esquemática del procedimiento experimental de acuerdo con una realización de la invención.
- Fig. 5: representación gráfica que compara la respuesta de la impedancia a lo largo de un período de 14 horas de *E. coli* sometida a estrés, es decir sometida a shock térmico, y de *E. coli* no sometida a estrés capturada de zumo de manzana.
- 45 Fig. 6: gráfico que representa la respuesta de la impedancia inicial de *E. coli* sometida a shock térmico.
- Fig. 7: gráfico que representa la respuesta de impedancia de *E. coli* no sometida a estrés.
- Fig. 8: gráfico que representa la respuesta de impedancia del crecimiento de 120 CFU/ml de *E. coli* a lo largo de un período de 8 horas, y un gráfico de la impedancia de un control negativo; y una vista despiezada complementaria de la parte del gráfico que muestra la respuesta de impedancia de *E. coli* durante los 30 primeros minutos de incubación, es decir, en este ejemplo la respuesta de impedancia inicial.
- 50 Fig. 9: gráfico que representa la respuesta de impedancia de 145 CFU/ml de *E. coli* desarrollada en una mezcla 1:1 de orina y un medio de caldo de tripticasa-soja (TSB).
- Fig. 10: gráfico que representa la respuesta de impedancia durante desviaciones metabólicas de aproximadamente  $5 \times 10^9$  CFU/ml de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) después de su exposición a diversas concentraciones de isoniazida (INH), todas las respuestas escaladas a un valor igual a 1.000 al comienzo.
- 55 Fig. 11: gráfico que representa la susceptibilidad de *M. bovis* donde, después de cuatro horas de crecimiento, se determinaron las pendientes de las curvas de viabilidad correspondientes (Fig. 10) y se normalizaron con respecto al crecimiento de *M. bovis* no tratado, y se representaron en el gráfico en función de sus respectivas concentraciones de fármaco; la pendiente normalizada de
- 60

modo similar para el mutante resistente INH<sup>R</sup>-4 se representa en el gráfico como un cuadrado en la esquina superior derecha.

Fig. 12A, 12B y 12C: gráficos que representan las respuestas de impedancia de concentrados plaquetarios (PC) sembrados con *E. coli* ( $4,0 \times 10^3$  CFU/ml), *Staphylococcus epidermidis* ( $3,2 \times 10^3$  CFU/ml); y *Propionibacterium acnes* ( $2,8 \times 10^3$  CFU/ml), respectivamente, junto con un gráfico de control negativo.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación se describen realizaciones preferentes de la invención. Se ha de entender que las realizaciones particulares de la invención se muestran a título ilustrativo y no como limitaciones de la invención. Al principio, la invención se describe en sus aspectos amplios y globales, y después siguen descripciones más detalladas de algunos aspectos. En las reivindicaciones se indican además las características y otros detalles de las composiciones y métodos de la invención.

La presente invención se refiere a métodos para detectar rápidamente la presencia de células viables, identificar el tipo de célula y determinar rápidamente la susceptibilidad de la célula a un agente externo. La invención proporciona una detección considerablemente más rápida de células viables y sus susceptibilidades correspondientes en comparación con los métodos utilizados en la actualidad, que se basan en la detección de un aumento de la biomasa debido al crecimiento de las células cultivadas o en la ausencia del mismo.

En términos generales, un aspecto de la invención proporciona un método para controlar una respuesta de estrés de una célula a un estresor, utilizando la detección de la impedancia para obtener esta información.

En otro aspecto, la invención se refiere a la detección de la presencia o ausencia de una célula viable, utilizando la detección de la impedancia para controlar la respuesta de estrés de la célula a un estresor.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para determinar la susceptibilidad de una célula a una concentración seleccionada de un estresor que comprende un agente bioactivo, y un nivel de estrés de la célula con la concentración seleccionada del agente bioactivo, utilizando la detección de la impedancia para obtener esta información.

#### La respuesta de estrés

El crecimiento de una población celular viable se determina mediante la multiplicación de una o más células incluidas en dicha población. Durante este crecimiento, las células utilizan los nutrientes disponibles para acumular energía, predominantemente en forma de ATP así como NADPH y fosfoenolpiruvato (PEP), y sintetizar macromoléculas biológicas, como ADN, ARN, proteínas, lípidos y carbohidratos. Por ejemplo, en caso de bacterias todos estos componentes son utilizados posteriormente para producir dos nuevas células hijas mediante el proceso conocido como fisión binaria. Si las condiciones de cultivo siguen siendo favorables, las dos células nuevas repetirán este ciclo. Esto se produce normalmente durante el crecimiento, también denominado crecimiento logarítmico.

Sin embargo, si las células son sometidas a condiciones desfavorables, como un entorno hostil, responden con una desviación metabólica espectacular, interrumpiendo los procesos de crecimiento y entrando en un modo de supervivencia conocido como "respuesta de estrés". Así, la síntesis regular de proteínas se suprime rápidamente mientras se activan nuevos regulones, lo que resulta en una mayor tolerancia de las células al factor de estrés, también designado aquí como "estresor".

Los estresores pueden incluir estresores químicos, físicos y biológicos. Ejemplos no limitativos de estresores químicos incluyen tratamientos con detergentes, con alcohol, con antibiótico, acidificación y alcalinización, oxidación y contacto con metales pesados. Ejemplos no limitativos de estresores físicos incluyen cambio de temperatura, ondas acústicas, sobrepresión de onda de choque, cambio de presión osmótica, radiación ionizante, descarga eléctrica y radiación electromagnética. Ejemplos no limitativos de estresores biológicos incluyen cambios en las condiciones del medio, fase estacionaria después de crecimiento, privación de nutrientes, incluyendo, por ejemplo, privación de carbono o nitrógeno, e hipoxia. Tal como se utiliza aquí, los términos "estrés" y "estresor" se refieren a cualquier combinación de estresores que pueda ser aplicada, modificada y/o eliminada en diversos momentos. Bajo determinadas condiciones de tensión y/o corriente aplicada, la propia medida de la impedancia puede ser considerada como un estresor y utilizada individualmente o junto con otros factores de estrés. La activación de la maquinaria de respuesta de estrés se produce normalmente en un plazo de minutos después de la aplicación del estímulo apropiado y alcanza su valor máximo aproximadamente entre 10 y 30 minutos después, dependiendo de la especie. Esta respuesta puede durar varias horas o más, dependiendo de la intensidad del estrés. Este período, que puede tener una duración real diferente en tipos de células excepcionales, se designará período de respuesta inicial.

Los estresores químicos, físicos y biológicos son agentes bioactivos. Tal como se utiliza aquí, el concepto "agente bioactivo" tiene el mismo significado que "agente biológicamente activo" y se refiere a cualquier agente o sustancia que tenga o sea capaz de mostrar cualquier actividad *in vivo* o *in vitro*. Ejemplos no limitativos de agentes bioactivos

químicos y biológicos útiles en una realización de la invención incluyen sustancias terapéuticas y agentes farmacéuticos, como agentes antimicrobianos, antibióticos, inhibidores de la trombina, agentes antitrombogénicos, trombolíticos, fibrinolíticos, inhibidores de espasmos vasculares, bloqueadores de los canales de calcio, vasodilatadores, agentes antihipertensores, inhibidores de los receptores de glicoproteína superficial, agentes antiplaquetarios, antimicóticos, inhibidores de microtúbulos, agentes antiseoretos, inhibidores de actina, inhibidores de remodelación, nucleótidos antisentido, antimetabolitos, antiproliferativos (incluyendo agentes antiangiogénesis), agentes quimioterapéuticos anticancerosos, esteroides antiinflamatorios o agentes antiinflamatorios no esteroideos, agentes inmunosupresores, hormonas, antagonistas de la hormona del crecimiento, factores de crecimiento, agonistas de dopamina, agentes radioterapéuticos, péptidos, proteínas, enzimas, componentes de matriz extracelular, inhibidores ACE, captadores de radicales libres, quelantes, antioxidantes, antipolimerasas, agentes antivirales, agentes de terapia fotodinámica y agentes de terapia genética.

De acuerdo con una realización de la invención, un estresor tal como un agente bioactivo se aplica a la célula mediante un método que comprende poner en contacto la célula con el agente bioactivo. En una realización particular, el agente bioactivo se elige de entre un agente farmacéuticamente activo, tal como un agente anticanceroso; una toxina biológica; un virus; y otra sustancia capaz de producir estrés, y combinaciones de éstos.

El estresor puede producir un estrés o estrés biótico o estrés fisiológico. Tal como se utilizan aquí, los conceptos "estrés" y "estrés biótico" tienen el mismo significado y se refieren a cualquier efecto adverso en el metabolismo, el crecimiento o la viabilidad de una población celular. El efecto adverso puede ser producido por un organismo vivo o por un estresor medioambiental no vivo o no biológico, como un cambio de temperatura.

La respuesta de estrés se caracteriza por un retraso y/o redireccionamiento significativo de la mayoría de los procesos metabólicos relacionados con el crecimiento. Estos incluyen una disminución del nivel de ATP, NADPH y PEP; una inhibición de replicación y el aumento de la condensación de ADN, junto con la desnaturalización local en ADN superhelicoidal. Además, también disminuyen la transcripción de ARN, la traducción de proteínas y la síntesis de lípidos y carbohidratos.

En esta etapa, las células estresadas entran en condiciones caracterizadas como detención de la división celular. Por consiguiente, todas las células se sincronizan en la misma etapa de su "ciclo de crecimiento" y, por ello, la mayoría de las células comenzarán la división celular en un momento similar después de pasar con éxito el período de estrés. Por ejemplo, en el caso de las bacterias de crecimiento rápido *Pseudomonas putida*, la detención de la división celular después de estrés puede durar hasta cuatro horas.

En conjunto, los genes codificadores de proteínas de respuesta de estrés están muy conservados entre diversas especies. Aunque algunos detalles de las respuestas de estrés a diferentes factores, por ejemplo choque térmico, SOS y estrés oxidante, pueden diferir a nivel molecular, en la mayoría de los casos las proteínas de choque térmico (hsp) desempeñan el papel más importante en la supervivencia celular durante el estrés inicial y después del mismo. Ya se han descrito proteínas de respuesta de estrés, en especial hsp, para prácticamente todos los organismos unicelulares y pluricelulares, tanto de origen procariótico, incluyendo la célula autorreplicante más pequeña conocida, *Mycoplasma genitalium*, y otras bacterias intracelulares estrictas, *Chlamydomonas reinhardtii*, como de origen eucariótico, incluyendo algas, plantas, hongos, protozoos, células animales y humanas. Incluso orgánulos de células eucariotas, como mitocondrias y cloroplastos, codifican sus propias hsp.

Las desviaciones en el metabolismo celular se manifiestan en cambios en las propiedades dieléctricas de una suspensión celular. El metabolismo celular modifica las propiedades dieléctricas, reflejando un cambio neto de compuestos cargados procedentes de productos metabólicos, cambios en la morfología celular, efectos de carga superficial, y síntesis de moléculas con carga alta, como ADN y ARN, junto con sales, proteínas, aminoácidos y otros constituyentes que pueden estar presentes en el medio. En una realización, estos cambios de las propiedades dieléctricas de una suspensión celular se miden registrando cambios en la impedancia eléctrica de la suspensión correspondiente.

Ahora hemos descubierto que el cambio en el valor de impedancia en una suspensión celular provocado por la respuesta de estrés de organismos vivos a un estresor es inmediato y más intenso que el cambio en el valor de impedancia en una suspensión celular resultante del crecimiento. El método aquí descrito controla directamente cambios en la respuesta de estrés de células inducidos por diferentes estresores, detectando cambios en la impedancia de una suspensión celular. A partir de estos cambios se puede deducir la presencia o ausencia de células viables y la susceptibilidad de las células a diferentes estresores.

Aunque se sabe que la respuesta de impedancia de una suspensión celular es el resultado de la actividad metabólica de las células, hasta la fecha se han infrautilizado las capacidades completas de la detección de la impedancia. Algunos trabajos previos pueden haber utilizado el término más amplio de desviaciones metabólicas (también designadas como actividad metabólica) para referirse al crecimiento, pero, tal como se utiliza aquí, el concepto "desviaciones metabólicas" se refiere a todos los procesos biológicos que se producen dentro de la célula, no solo los que están relacionados con el crecimiento y la reproducción. Nosotros damos a conocer la medición de la impedancia para detectar las desviaciones metabólicas asociadas a la respuesta de estrés y no solo aquellas que

están asociadas con el crecimiento. Hemos demostrado la utilidad de estas capacidades de detección de la impedancia para indicar la presencia de diferentes especies de bacterias mediante el control de las desviaciones metabólicas iniciales de células estresadas.

### Las células

5 Es importante señalar que la respuesta de estrés es general y no exclusiva de cualquier célula o microorganismo. Por consiguiente, los métodos dados a conocer son aplicables a todas las células procariotas o eucariotas. Los métodos descritos son particularmente útiles para determinar la presencia o ausencia de un patógeno y la susceptibilidad del patógeno a una concentración dada de un agente bioactivo, tal como un agente antimicrobiano.

10 Los métodos de acuerdo con diversas realizaciones de la invención incluyen, por ejemplo, un método para controlar rápidamente una respuesta de estrés de una célula a un estresor y determinar la magnitud de la respuesta de estrés; un método para detectar rápidamente la presencia o ausencia de una célula mediante el control de una respuesta de estrés de la célula, si ésta está presente, o la ausencia de la respuesta de estrés si dicha célula no está presente o está muerta; y un método para determinar un resultado predictivo de la susceptibilidad de una célula a una concentración seleccionada de un agente bioactivo y un nivel de estrés de la célula a la concentración seleccionada del agente bioactivo, siendo el nivel de susceptibilidad de la célula previamente conocido o desconocido. Los métodos descritos son particularmente útiles para analizar bacterias, incluyendo patógenos de origen no bacteriano.

20 Tal como se utiliza aquí, el término "detectar" incluye, aunque no de forma exclusiva, determinar la presencia o ausencia de una célula, o cuantificar la cantidad de las células. Por consiguiente, el término se refiere al uso de los materiales, composiciones y métodos de la presente invención para determinaciones cualitativas y cuantitativas.

25 Ejemplos de células eucariotas adecuadas para su uso en un método de acuerdo con una realización de la invención incluyen protistas, protozoos, hongos, una célula humana no transformada, una célula animal no transformada, una célula humana transformada, una célula animal transformada, con la condición de que, si la célula eucariota es dependiente de la adhesión, el medio de la muestra de ensayo comprende adicionalmente perlas de microcultivo suspendidas que incluyen un revestimiento de una matriz extracelular capaz de adherirse a la célula eucariota.

30 Para un tipo particular de célula procariota o eucariota puede ser necesario o útil que el medio de la muestra de ensayo y el medio de la muestra de referencia comprendan adicionalmente perlas suspendidas que incluyen un revestimiento de receptores específicos capaces de adherirse a las células procariotas o eucariotas. Los receptores pueden comprender componentes biológicamente activos seleccionados de entre: componentes generados a partir de respuestas inmunológicas, componentes generados a partir de ácidos nucleicos y componentes generados a partir de otros compuestos químicos o bioquímicos que pueden ser utilizados para identificar células específicas.

### El medio y la muestra

35 Medios adecuados para su uso en un método de acuerdo con una realización de la invención se pueden elegir entre un medio que no soporte la viabilidad de la célula y un medio que soporte la viabilidad de la célula durante un período de tiempo suficiente para medir una respuesta de estrés. La selección el medio dependerá del tipo de célula y la naturaleza del análisis a realizar. Ejemplos no limitativos de medios adecuados incluyen medios de cultivo comerciales, caldos acuosos, geles y medios basados en agar. En una realización preferente, los medios tienen cierta conductividad eléctrica.

40 Tal como se utiliza aquí, el término "muestra" se refiere a cualquier cosa que pueda contener una fracción a aislar, manipular, medir, cuantificar, detectar o analizar utilizando dispositivos adecuados de acuerdo con los métodos descritos. La muestra puede ser una muestra biológica, como un fluido biológico o un tejido biológico, o una muestra medioambiental o industrial que contiene material biológico o potencialmente biológico. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen suspensiones celulares en un medio, como un medio de cultivo celular, orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputos, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco, líquido amniótico o similares.

45 Los ejemplos de muestras medioambientales o industriales incluyen suspensiones celulares en una muestra de agua, una muestra cosmética, una muestra alimentaria, una muestra farmacéutica o similares.

### Medida de la respuesta de impedancia inicial

50 El uso de medidas de impedancia eléctrica para controlar el crecimiento celular está bien establecido. Los sistemas comerciales que utilizan este método miden normalmente la conductancia, la capacitancia o la impedancia completa (tanto los componentes resistivos como los reactivos) y emplean geometrías que requieren un crecimiento considerable para ser detectadas. En el caso de las bacterias, el umbral de crecimiento típico necesario para la detección con estos sistemas es de un millón ( $10^6$ ) CFU/ml o más. La obtención de un título tan alto requiere un tiempo considerable, en especial si las bacterias pertenecen a especies de crecimiento lento.

Las realizaciones de la presente invención utilizan la detección de la impedancia de forma que permite detectar de manera considerablemente más rápida células viables detectando un cambio de impedancia debido a la respuesta de estrés. La respuesta de impedancia de una suspensión celular está en correlación con las actividades metabólicas integradas dentro de dicha suspensión y proporciona considerablemente más información que otros métodos no invasivos que solo detectan aumentos de la biomasa durante la multiplicación celular y el correspondiente crecimiento poblacional. Además, también se pueden producir desviaciones metabólicas sin división celular y, en consecuencia, estos cambios metabólicos no serían detectados por otros sistemas basados en un aumento de la biomasa por multiplicación celular y correspondiente crecimiento de la población. Así, los métodos y análisis de detección de la impedancia descritos proporcionan una mejor detección y análisis del estrés celular en suspensiones celulares.

En general, puede emplearse el término "impedancia" para describir las propiedades eléctricas globales de una muestra y su respectiva capacidad para impedir el flujo de corriente. La impedancia se puede medir con potenciales o corrientes variables en el tiempo de una frecuencia específica. Si se aplica una tensión CA sinusoidal a través del volumen de la muestra, con cierta frecuencia,  $v$ , se producirá un flujo de corriente a través del medio. La corriente, al alternar con la misma frecuencia que la tensión, tendrá cierta relación de fase con la tensión aplicada. La impedancia de la muestra se define por la relación entre las magnitudes de la tensión y la corriente y el ángulo de fase relativa entre ellas.

La interpretación física de la medida de la impedancia se describe mejor mediante los dos siguientes componentes: el componente resistivo y el componente reactivo. La resistencia y la reactancia son propiedades a combinar para averiguar la impedancia de un sistema. No obstante, los términos tales como "resistencia" y "reactancia" se designan a veces sin mucha precisión como "impedancia", o como una representación de la impedancia.

Alternativamente, para excitar una muestra con el fin de determinar parámetros de impedancia asociados a la misma se puede utilizar cualquier señal conocida variable con el tiempo que incluya un grupo de componentes de frecuencia. En general, la señal puede ser un voltaje, una corriente o una combinación de voltaje y corriente. Puede incluir simultáneamente muchos componentes de frecuencia diferentes y, en el caso de "ruido blanco de banda limitada", puede incluir cualquier frecuencia dentro de un determinado ancho de banda. Mediante el uso de cualquiera de estas excitaciones se puede medir una respuesta correspondiente de corriente, tensión o tensión y corriente. Con cualquier frecuencia dada, la impedancia de la muestra es la relación entre la tensión compleja y la corriente compleja. Esta impedancia se puede representar mediante un par de números, como magnitud y fase, o real e imaginaria. Bajo determinadas condiciones, la respuesta puede incluir componentes de frecuencia que no estaban en la señal de excitación y que, en consecuencia, pueden contener información adicional sobre la muestra.

La corriente alterna (CA) permite determinar con mayor facilidad una propiedad crítica, la capacitancia, que es relevante para los métodos de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. Un condensador simple puede incluir un par de conductores eléctricos, como placas metálicas, separados por un material no conductor o aislante. La cantidad de carga eléctrica separada que se puede almacenar o mantener en el condensador por unidad de potencial eléctrico entre los conductores se puede designar como su capacitancia. Las mediciones de una suspensión celular rodeada por dos electrodos se pueden considerar como un condensador biológico.

Aunque los ejemplos aquí presentados utilizan medidas de capacitancia para controlar una respuesta de estrés, también entra dentro del alcance de esta divulgación la utilización de cualquier otra medición eléctrica unidimensional o multidimensional, como conductancia, susceptibilidad, admitancia o cualquier otra representación o transformación del vector de impedancia para medir la respuesta de estrés de células sin salirse del alcance de la invención definido por las reivindicaciones adjuntas. Mediante tan solo una experimentación rutinaria o unos ajustes simples, los expertos en la técnica podrían utilizar no solo la capacitancia para mediar la respuesta de estrés de acuerdo con una realización de la invención, sino también todas las representaciones de mediciones eléctricas, como la impedancia. Además, la aplicación de un campo eléctrico se puede llevar a cabo mediante diversos medios, incluyendo cualquier combinación de tensión y/o corriente. Todas y cada una de las referencias a un dieléctrico pueden incluir su caracterización completa "no ideal" y no estar restringidas a su componente reactivo de impedancia.

Aunque los diferentes tiempos entre el crecimiento y las respuestas de estrés proporcionan mucha información valiosa, la respuesta de impedancia también incluye una cantidad enorme de información. Incluso en caso de un grupo de medidas de impedancia relativamente simple, cada valor de impedancia individual medido a lo largo de un intervalo simple consiste al menos en un vector bidimensional y el cambio entre cada par de muestras también consiste al menos en un vector bidimensional. Por consiguiente, incluso en caso de una señal de excitación muy simple se puede producir una gran cantidad de vectores de cambio y sus derivados. Además de esta cantidad esencial de información sobre la naturaleza de la respuesta celular, también se puede generar un grupo de puntos de datos de vector individual para cada señal de excitación posible. Cada señal de excitación puede estar compuesta por un solo componente de frecuencia o cualquier grupo de frecuencias realizable. Además, el sistema puede cambiar entre diversas señales de excitación diferentes durante el análisis de una muestra simple para generar aún más información. Bajo determinadas circunstancias, las frecuencias de salida serán diferentes a las frecuencias de entrada, con lo que se obtiene todavía más información dentro del perfil de respuesta de impedancia.

- Puede ser difícil visualizar o pensar en la enorme cantidad de información incluida dentro de la respuesta de impedancia y, en consecuencia, con frecuencia se pueden utilizar representaciones más simples. Por ejemplo, las referencias a la capacitancia, resistencia, reactancia o señales positivas y negativas pueden ser convenientes para representar e interpretar los resultados. Este vasto espacio multidimensional de la respuesta de impedancia se puede transformar matemáticamente en una cantidad infinita de espacios de representación unidimensionales o multidimensionales. Evidentemente, es posible alinear o transformar un espacio de coordenadas de modo que sus ejes se correspondan mejor con cualquier comportamiento particular o propiedad de interés.
- Así, por ejemplo cualquier referencia a un signo o cantidad particular se podría cambiar matemáticamente con facilidad sin que ello afecte a los principios que subyacen a esta invención. En una realización de la invención se utilizan métodos diferenciales para obtener un mayor nivel de precisión.
- En una realización, los perfiles de impedancia resultantes reflejan una comparación de mediciones de un par de cámaras estériles mecánicamente idénticas. Por ejemplo, la primera cámara puede contener un medio que incluye células estresadas, mientras que la segunda cámara contiene un medio estéril y libre de células. Alternativamente, la primera cámara puede contener un medio y células no estresadas, y se puede añadir un estresor al medio. La segunda cámara, que sirve como referencia, está situada muy cerca de la primera, de modo que los dos volúmenes están sometidos a perturbaciones térmicas y mecánicas prácticamente idénticas, proporcionando un medio de rechazo común. A través de los dos electrodos se aplica una pequeña corriente alterna (CA), creando un condensador de placas paralelas.
- Las células estresadas de la primera cámara cambian las propiedades dieléctricas de la suspensión celular en respuesta al estrés. También se pueden observar algunos cambios en las propiedades dieléctricas derivados de interacciones entre los compuestos orgánicos del medio, también comunes en relación con la primera cámara. Después se comparan los cambios en los perfiles de impedancia de las muestras de las dos cámaras con el tiempo. Cualquier diferencia detectada entre las dos muestras refleja las actividades celulares provocadas exclusivamente por la respuesta de estrés de los organismos.
- De acuerdo con una realización de la invención, en un momento específico o a lo largo de una serie de momentos se mide una respuesta de impedancia inicial de una muestra de ensayo de la suspensión celular después de aplicar un estresor. Tal como se utiliza aquí este concepto, la "respuesta de impedancia inicial" de una muestra, como la muestra de ensayo, es un cambio de impedancia de la muestra de ensayo durante el período de transición entre una primera medida de impedancia de la muestra de ensayo aproximadamente en el momento de aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento. En una realización de la invención, la impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente puede tener lugar en el momento en que se comenzaría a detectar la ausencia de crecimiento.
- La "respuesta de impedancia inicial", tal como se describe más arriba, se puede referir a un período de transición de una medida de impedancia de la muestra de ensayo. Alternativamente, la "respuesta de impedancia inicial" se puede referir a un período de transición de una medida de impedancia de una muestra modificada por una medición relacionada obtenida aproximadamente en un momento similar.
- Además, de acuerdo con otra realización de la invención, se determina un Perfil de Respuesta de Impedancia (IRP) de la muestra de ensayo. El IRP se basa en la comparación matemática del nivel de la respuesta de impedancia inicial medida de la muestra de ensayo con un valor estándar. Alternativamente, el IRP se puede basar en una comparación matemática de una medida de la impedancia de una muestra de ensayo con un valor estándar antes de la construcción matemática de la respuesta de impedancia inicial. El valor estándar puede ser el valor de la respuesta de impedancia inicial medida o en la impedancia medida de una primera muestra de referencia que incluye el medio con o sin el estresor, estando la primera muestra de referencia desprovista de células. Alternativamente, el valor estándar puede ser el valor de la respuesta de impedancia inicial medida o en la impedancia medida de una segunda muestra de referencia que incluye la célula y el medio, estando la célula presente en la misma concentración que la célula en la muestra de ensayo, estando la segunda muestra de referencia desprovista del estresor, y consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de referencia en un cambio de impedancia de la segunda muestra de referencia durante el período de transición desde una primera medida de la impedancia de la segunda muestra de referencia aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento.
- El IRP refleja las desviaciones metabólicas que se producen dentro de la suspensión celular. En una realización, cuando el valor del IRP aumenta constantemente durante un período de tiempo que sobrepasa de forma significativa el tiempo necesario para multiplicar por dos la población celular, se está produciendo crecimiento. Cuando el valor del IRP disminuye durante un período de tiempo menor o aproximadamente igual al tiempo necesario para multiplicar por dos la población celular, se está produciendo estrés. Así, la ausencia de crecimiento (es decir, división celular) en el caso de células bajo estrés está definida por la medición de un segundo valor del IRP que inferior al valor registrado en una primera medida anterior en una cantidad superior a la incertidumbre estadística de las dos

medidas. Aunque una disminución del valor del IRP es suficiente para determinar el estrés, no siempre es necesaria. En algunos casos, la evaluación del estrés o la ausencia de crecimiento se puede reconocer tanto mediante valores del IRP con un crecimiento estadísticamente significativo seguidos por valores posteriores decrecientes, o mediante valores del IRP con un decrecimiento estadísticamente significativo seguidos por valores posteriores crecientes durante un período menor o aproximadamente igual al tiempo necesario para multiplicar por dos la población celular. La presencia de estrés también se puede deducir mediante un IRP de células con estrés menor que el IRP de células no estresadas.

El final del período de estrés y el comienzo correspondiente del crecimiento se pueden determinar mediante el perfil de respuesta de impedancia en un tiempo mayor que aquel necesario para multiplicar por dos la población celular en un punto de infección cuando la pendiente del perfil de respuesta de impedancia cambia de una pendiente negativa a una pendiente positiva.

La medición de la respuesta de estrés también se puede diferenciar del crecimiento comparando los perfiles de respuesta con grupos de datos de experimentos previamente registrados. Estableciendo la correspondencia entre el comportamiento de impedancia y respuestas conocidas de experimentos similares se puede realizar una determinación en un momento específico para cualquier intervalo de confianza estadística deseado. Cuando se desea una confianza estadística mayor se puede prolongar el intervalo de tiempo que comprende la respuesta de impedancia inicial. Además, el grado en el que los resultados medidos corresponden a grupos almacenados de valores esperados también puede prolongar la respuesta de impedancia inicial para aumentar la confianza estadística. En los siguientes ejemplos, las respuestas de estrés y crecimiento son diferentes y su parametrización se puede ajustar utilizando los tiempos necesarios para multiplicar por dos las poblaciones celulares particulares dentro de la muestra ensayada.

Después de la determinación del IRP, el análisis del IRP puede permitir, por ejemplo, la detección de una célula, la determinación de información referente a la respuesta de una célula a un estresor dado y la determinación de la susceptibilidad de una célula a una concentración dada de un agente bioactivo.

En referencia ahora a las figuras, tal como está representado esquemáticamente en la Fig. 1, una realización de la tecnología de impedancia descrita se puede poner en práctica en un dispositivo fácil de manejar y relativamente económico. Por ejemplo, el sistema se puede diseñar utilizando un cassette que aloja un panel de cámaras de ensayo sensibles. El cassette puede ser de tipo desechable. En una realización de la invención, todos los elementos de detección están integrados dentro de un cassette plano dimensionado a media escala, con un factor de forma similar a una tarjeta de crédito e ideal para las técnicas de producción en serie establecidas. El uso de una geometría a media escala permite analizar muestras con tamaños volumétricos prácticos sin una concentración adicional de células, generando al mismo tiempo señales con una alta ganancia de señal para mediciones sensibles. Una vez cargado por ejemplo con medio y muestras de ensayo tratadas o no tratadas, el cassette se puede insertar en un dispositivo de soporte para lectura que controla las impedancias y analiza, presenta y registra la información. En la Fig. 1 se muestra un ejemplo de diseño conceptual de un dispositivo de cassette múltiple, un biosensor de impedancia con el diseño de un ordenador portátil, a utilizar en una realización de la invención.

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un cassette (20), mostrando un cassette (26) basado en una geometría plana. Dentro de cada cassette (26) hay un panel de cámaras de detección (32), tal como muestra la Fig. 2. Cada cámara (32) está construida con dos electrodos (34) con huecos de separación relativamente pequeños. Tal como se utiliza aquí, el término "electrodo" se refiere a una estructura de alta conductividad eléctrica, es decir, una conductividad eléctrica mucho mayor que la conductividad eléctrica de los materiales circundantes. El usuario inyecta una muestra de ensayo directamente en un acceso de carga (22) situado sobre el cassette (26) y la muestra se distribuye en la cámara de detección (32). El cassette (26) se inserta en un dispositivo analizador (28) para su lectura. Después se registra la impedancia eléctrica de cada cámara, controlando los cambios respectivos en las propiedades dieléctricas de las suspensiones celulares.

Aunque en estos ejemplos se utilizan dos electrodos (34), la invención se puede realizar en un sistema que utilice más de dos electrodos (34) por cámara (32). Cada electrodo (34) puede estar compuesto por uno o más materiales que pueden producir o no un efecto electroquímico dentro de la muestra.

Las muestras de ensayo pueden ser sometidas a estrés permitiendo que un estresor impacte en la muestra, eligiéndose el estresor entre un estresor aplicado antes, un estresor aplicado esencialmente de forma simultánea y un estresor aplicado después de la aplicación del campo eléctrico o de la carga de las cámaras de detección (32).

La Fig. 2 es un diagrama de bloques esquemático (30) que representa un sistema de detección de control de impedancia. La plataforma comprende un cassette (26) que contiene múltiples cámaras de detección (32), incluyendo cada cámara (32) dos electrodos (34); y un analizador (28), tal como muestra esquemáticamente la Fig. 1, que recibe el cassette (26) y controla la respuesta de estrés de una suspensión celular en tiempo real. El analizador (28) incluye un relé conmutador (36), un Precision LCR meter (38), la interfaz GPIB (40), el ordenador o PC (41) y el termopar DAQ (42).

A continuación se proporciona una descripción generalizada del funcionamiento del sistema de acuerdo con una realización de la invención. Un cassette de ensayo (26) de calidad para investigación a media escala cargado manualmente con dos muestras biológicas independientes en cámaras de detección separadas (32) se inserta en un dispositivo de soporte de montaje aislado térmicamente para mantener el cassette (26) estable durante la medida, mantener la estabilidad térmica y establecer contacto eléctrico con el analizador (28). El dispositivo de soporte incluye dos pletinas controladas térmicamente sobre las que están montadas protecciones eléctricas para proteger el cassette (26) de capacitancias parásitas. La temperatura de las pletinas se controla utilizando un termopar empotrado y se registra empleando un sistema de adquisición de datos (DAQ) (42) (como los facturados por National Instruments). La impedancia se puede medir utilizando un medidor comercial, AGILENT® 4284A Precision LCR meter (38) (AGILENT® Technologies, Inc., Palo Alto CA). Este medidor de impedancia (38) solo era capaz de controlar un único canal a la vez y, en consecuencia, se construyó una caja de relés de conmutación (36) para conmutar entre las dos cámaras de detección (32). El medidor AGILENT® (38) estaba en comunicación con un ordenador (41) utilizando una interfaz de placa GPIB (40) estándar. El ordenador (451) registró, analizó y presentó los datos. Para proporcionar una interfaz fácil de utilizar para los dos experimentos en marcha y realizar análisis básicos se escribió un programa de *software* (disponible en BioSense Technologies, Inc., Woburn, MA).

En el ejemplo ilustrado, el sistema funcionaba con corriente alterna (CA), realizándose mediciones aproximadamente a un kilohercio (1 kHz). No obstante se pueden realizar ajustes simplemente mediante experimentación rutinaria.

Las impedancias de las dos cámaras de detección (32) se registran controlando los cambios en las propiedades dieléctricas de la suspensión biológica. Tal como se describe más arriba, las respectivas propiedades dieléctricas se modifican debido al metabolismo celular por el cambio neto de compuestos cargados de productos metabólicos, cambios en la morfología celular, efectos de carga superficial, ADN, ARN, y otras moléculas con alta carga, como proteínas y aminoácidos.

La comparación utilizada para determinar el IRP para el Ejemplo 1 fue la relación entre el componente capacitivo de la impedancia en cada momento de medición de la cámara que contenía las células y el de la cámara que solo contenía el medio.

Un método descrito para controlar rápidamente una respuesta de estrés de una célula a un estresor y determinar la magnitud de la respuesta de estrés comprende: a) bajo condiciones adecuadas para controlar la tensión y/o la corriente, aplicar un campo eléctrico a una muestra de ensayo que comprende la célula suspendida y un medio; b) controlar la tensión y/o la corriente; c) permitir que un estresor afecte a la muestra de ensayo, eligiéndose el estresor entre un estresor aplicado antes de la aplicación del campo eléctrico, un estresor aplicado esencialmente de forma simultánea con dicha aplicación del campo eléctrico y un estresor aplicado después de la misma; d) controlar una respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo, consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en un cambio de impedancia de la muestra de ensayo durante el período de transición desde una primera medida de la impedancia de la muestra de ensayo aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento, controlando así la respuesta de estrés de dicha célula al estresor; y e) determinar el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo, siendo el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo una indicación de la magnitud de la respuesta de estrés de la célula, determinándose la magnitud de la respuesta de estrés de la célula al estresor.

El método descrito para controlar una respuesta de estrés de una célula y determinar la magnitud de la misma puede incluir adicionalmente la comparación matemática del nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinado en el paso (e) con: (i) un primer valor estándar que representa la respuesta de impedancia de una primera muestra de referencia que incluye el medio con o sin el estresor, estando la primera muestra de referencia desprovista de células; y/o(ii) un segundo valor estándar que representa la respuesta de impedancia inicial de una segunda muestra de referencia que incluye una célula y el medio, siendo la célula de la muestra de referencia del mismo tipo y estando presente en la misma concentración que la célula en la muestra de ensayo, y estando la muestra de referencia desprovista del estresor; y determinar un valor para un Primer Perfil de Respuesta de Impedancia de la muestra de ensayo, estando basado el valor del Primer Perfil de Respuesta de Impedancia en la comparación matemática del nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinado en el paso (e) con el primer valor estándar y/o el segundo valor estándar.

El Ejemplo 1 se refiere a un experimento que demuestra una respuesta de impedancia inicial inmediata de *E. coli* estresada por shock térmico en comparación con *E. coli* no estresada.

### **Ejemplo 1: Respuesta de impedancia inicial de bacterias estresadas por shock térmico**

Es sabido que el metabolismo bacteriano después de un shock térmico se desvía considerablemente con respecto al de células bacterianas no sometidas a este shock térmico. En este ejemplo se muestra la capacidad para medir la respuesta de impedancia inicial de células bacterianas estresadas durante este período de recuperación. En primer lugar se midió la respuesta de impedancia inicial de *E. coli* no sometida a tratamiento de shock. Una colonia simple de un cultivo en una noche sobre agar Luria Bertani (LBA) (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) se

recogió con un asa estéril, se resuspendió en TSB y, después de una dilución apropiada a aproximadamente 1.000 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro ( $10^3$  CFU/ml), se transfirió directamente a una de las cámaras del cassette de impedancia, mientras que la cámara adyacente se cargó solo con TSB. El cassette se insertó en el analizador de temperatura controlada, que se mantenía a 37 grados Celsius (37°C), y se registró el vector de impedancia completo. En los datos que se presentan aquí se analizaron los componentes de capacitancia de las señales de impedancia iniciales. Mediante el análisis de otras representaciones del vector de impedancia se puede ver un efecto similar.

Para medir la respuesta de las bacterias estresadas, una colonia simple de un cultivo de una noche sobre LBA se recogió con un asa estéril, se resuspendió en una solución salina tampón fosfato (PBS) y se calentó a 45 grados Celsius (45°C) durante 30 minutos. Después de aplicar el tratamiento de shock, la suspensión bacteriana se diluyó en TSB y se transfirió directamente a una de las cámaras del cassette, mientras que la cámara adyacente se cargó con TSB. Como en el caso anterior, el cassette se insertó en el analizador de temperatura controlada, que se mantenía a 37 grados Celsius (37°C), y se registraron las señales de capacitancia.

La Fig. 3 muestra el "Perfil de Respuesta de Impedancia", representado aquí como la relación entre las respectivas capacitancias de la cámara que contenía células sometidas a tratamiento de shock y las capacitancias de la cámara que solo contenía TSB. La Fig. 3 es una representación gráfica del Perfil de Respuesta de Impedancia Inicial de *E. coli* no estresada (curva superior) y *E. coli* sometida a shock térmico (curva inferior), en TSB a 37 grados Celsius (37°C). Los títulos iniciales fueron de  $5,6 \times 10^3$  CFU/ml en el caso de las células no estresadas y de  $4,4 \times 10^3$  CFU/ml en el caso de las células estresadas por calor. Como se esperaba, después de una demora típica por fase de latencia de aproximadamente 1,5 a 2,0 horas, las bacterias no estresadas comenzaron a crecer y el valor correspondiente de la respuesta de impedancia comenzó a aumentar. En cambio, la respuesta de impedancia de bacterias sometidas a shock térmico muestra la tendencia opuesta, en concreto se observó una disminución inmediata y constante del valor de la respuesta de impedancia que continuó a lo largo de 5 horas de la adquisición de datos. Esta disminución del valor de la respuesta de impedancia está provocada por la respuesta de estrés celular. Por consiguiente, la ausencia de crecimiento (es decir, división celular) en el caso de células bajo estrés se puede definir mediante la medida de un segundo valor de respuesta de impedancia menor que el valor registrado en una primera medición anterior en una cantidad superior a la incertidumbre estadística de las dos medidas. En este ejemplo se puede reconocer una respuesta de impedancia inicial inequívoca con una alta confianza estadística en menos de 30 minutos. El tiempo transcurrido también está dentro del tiempo aproximado necesario para multiplicar por dos la población celular de esta especie de bacterias en la muestra analizada. Teniendo en cuenta que estas células están en detención de división celular provocada por estrés, esto sirve como evidencia de la ausencia de crecimiento durante el tiempo necesario para nuestras mediciones.

Así, la respuesta de impedancia de las células viables estresadas y su consiguiente detección es más rápida y potencialmente más fuerte que la respuesta de impedancia observada durante el crecimiento normal (es decir, la proliferación celular).

Para asegurar que esta disminución no se debía a muerte bacteriana se llevó a cabo un recuento bacteriano mediante disposición en placas por goteo y no se observaron diferencias significativas entre las cantidades de células viables de la muestra no estresada y la muestra sometida a shock térmico, una prueba más de que no se produjo crecimiento celular o muerte celular durante el tiempo de medida.

#### 40 **Detección de la presencia o ausencia de una célula**

El método descrito para detectar rápidamente la presencia o ausencia de una célula mediante el control de una respuesta de estrés de la célula si ésta está presente, o la ausencia de la respuesta de estrés si dicha célula no está presente o está muerta, comprende: a) bajo condiciones adecuadas para controlar la tensión y/o la corriente, aplicar un campo eléctrico a una muestra de ensayo que comprende la célula y un medio; b) controlar la tensión y/o la corriente; c) permitir que un estresor afecte a la muestra de ensayo, eligiéndose el estresor entre un estresor aplicado antes de la aplicación del campo eléctrico, un estresor aplicado esencialmente de forma simultánea con dicha aplicación del campo eléctrico y un estresor aplicado después de la misma; d) en un momento específico o a lo largo de una serie de momentos, medir una respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo, consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en un cambio de impedancia de la muestra de ensayo durante el período de transición desde una primera medición de la impedancia de la muestra de ensayo aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento; y e) evaluar el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en cada momento, siendo el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en cada momento una indicación del nivel de la respuesta de estrés de dicha célula, con lo que se controla la respuesta de estrés de dicha célula al estresor si dicha célula está presente en la muestra de ensayo, o la ausencia de la respuesta de estrés si dicha célula no está presente en la muestra de ensayo o si está muerta; y así detectar rápidamente la presencia o ausencia de dicha célula en la muestra de ensayo. Este método se puede perfeccionar tal como se describe más abajo.

El método de detección puede comprender adicionalmente confirmar la presencia o ausencia de dicha célula en la muestra de ensayo mediante: (i) medir una respuesta de impedancia de una primera muestra de referencia que incluye el medio con o sin el estresor, estando la primera muestra de referencia desprovista de células; y/o (ii) medir una respuesta de impedancia inicial de una segunda muestra de referencia que incluye dicha célula y el medio, estando dicha célula en la misma concentración que la célula en la muestra de ensayo, estando la segunda muestra de referencia desprovista del estresor, y consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de referencia en un cambio de impedancia de la segunda muestra de referencia durante el período de transición desde una primera medida de la impedancia de la segunda muestra de referencia aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento; comparar la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo obtenida en el paso (d) con la respuesta de impedancia de la primera muestra de referencia y/o la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de referencia; y evaluar la comparación del paso (iii), Ejemplos no limitativos de este método de detección incluyen los siguientes.

### Ejemplo 2: Detección específica de células

Como demostración de la detección rápida y específica de células en una muestra, se presentan datos referentes a la captura y detección de *E. coli* en zumo de manzana. Se ha llevado a cabo una serie de experimentos para comparar la detección de *E. coli* en zumo de manzana contaminado deliberadamente mediante el control directo del crecimiento y la respuesta de estrés. La Fig. 4 muestra una descripción esquemática del procedimiento experimental. Un volumen de 10 ml de zumo de manzana estéril se sembró con aproximadamente  $10^3$  CFU/ml de *E. coli* O157:H7 (véase la Fig. 4A). También se añadieron perlas magnéticas (Dynal Biotech, Oslo, Noruega) previamente revestidas con anticuerpos específicos para nuestra cepa sobre *E. coli* (véase la Fig. 4B).

Nuestro protocolo para la captura celular cumplía estrictamente las recomendaciones del fabricante. Una vez capturados, los complejos célula-anticuerpo se recuperaron utilizando las perlas magnéticas y se lavaron y resuspendieron en TSB (véase la Fig. 4C), y la suspensión resultante se cargó en el cassette (véase la Fig. 4D). La cámara adyacente (referencia) se cargó con un medio similar, pero sin células. Para estudiar la respuesta de estrés, las bacterias recuperadas del zumo de manzana sembrado se sometieron a tratamiento térmico durante 30 minutos a 45°C. Las señales de impedancia de estas suspensiones se registraron con el tiempo y se analizaron. Además, todas las suspensiones se sometieron a recuento utilizando métodos estándar de disposición en placas.

Resultados. La Fig. 5 muestra un gráfico de la Respuesta de Impedancia a lo largo de un período de 14 horas de la *E. coli* capturada sometida a shock térmico, junto con mediciones de *E. coli* capturada de modo similar pero no estresada. El valor de la respuesta de impedancia de células no estresadas (curva superior) comienza a aumentar aproximadamente a los 60 minutos y es claramente reconocible antes de 180 minutos (véase la Fig. 7). La curva alcanza finalmente su valor máximo aproximadamente a las 7 horas, seguido por una disminución durante aproximadamente 2 horas antes de aumentar de nuevo. La señal creciente, la llegada al valor máximo y la posterior disminución están en correlación con el consumo de oxígeno (estrés hipóxico) y su agotamiento final en el medio de cultivo, y corresponden al crecimiento aeróbico seguido por hipoxia y crecimiento anaeróbico para el anaerobio facultativo.

En la Fig. 5, la respuesta de impedancia de células no estresadas se compara directamente con la respuesta de impedancia de células estresadas por shock térmico (curva inferior) con densidades celulares correspondientes (aproximadamente 1.000 CFU/ml) junto con un control negativo que no contiene ninguna célula (curva central plana). Se puede ver que el valor de la respuesta de impedancia durante la respuesta de estrés celular domina al de las células no estresadas, tanto en intensidad como en tiempo de detección.

Para acentuar aún más la diferencia entre la respuesta de las células estresadas y las no estresadas, el valor de la respuesta de impedancia de las células estresadas disminuye inmediatamente alcanzando un valor mínimo a las 7 horas antes de presentar una respuesta similar a la de las células normales o no estresadas. Tal como se puede ver aquí, la recuperación y el posterior reingreso en el estado de crecimiento de las células sometidas a shock térmico, de acuerdo con la medición a través de su respuesta de impedancia correspondiente, se demora durante más de 5 horas, como se esperaba. Además, la intensidad de la respuesta es mucho mayor y su aparición es mucho más rápida que la respuesta de impedancia de células no estresadas, demostrando así que la respuesta de impedancia inicial de las células sometidas a shock térmico es más fuerte y más inmediata que la respuesta de impedancia de las células no estresadas.

La Fig. 6 y la Fig. 7 muestran gráficos de las respuestas de impedancia durante los períodos de medición inicial de las respectivas curvas de crecimiento para una comparación en paralelo. El examen de la Fig. 6 muestra que con este nuevo método es posible detectar en tan solo 15 minutos la disminución clara del valor de la respuesta de impedancia de  $1,2 \times 10^3$  CFU/ml de *E. coli* no estresada cuando se mide la respuesta de impedancia inicial, más de 10 veces más rápido que con el control de impedancia sensible del crecimiento de bacterias no estresadas. Esto se ha de comparar con las 14 horas o más requeridas en los métodos de detección convencionales.

### Ejemplo 3: Respuesta de Impedancia durante las primeras 8 horas de crecimiento de *E. coli*

La Fig. 8 muestra un gráfico de la respuesta de impedancia registrada durante las 8 primeras horas de crecimiento de *E. coli* (siembra - 120 CFU/ml) recuperada de zumo de manzana sembrado. Los 120 minutos iniciales de la medición han sido ampliados y presentados como un gráfico insertado en la misma figura. La respuesta de pendiente negativa observada durante los primeros 30 minutos antes de la aparición de la señal creciente bien definida se interpreta como la actividad biológica de células viables pero no en división, que están experimentando el, así llamado, estrés por "nuevo medio". En la microbiología clásica, este periodo de crecimiento bacteriano se denomina de fase de latencia o tiempo necesario para la adaptación bacteriana a las nuevas condiciones de cultivo. La fase de latencia microbiana es un fenómeno complejo que todavía no se entiende por completo. Nosotros observamos que 1.) la Respuesta de Impedancia de células estresadas es similar a la de células no estresadas durante la fase de latencia, y 2.) las células estresadas que vuelven a sus condiciones de crecimiento óptimo muestran fases de latencia más largas.

Basándonos en estas dos observaciones, interpretamos que la fase de latencia observada en la Fig. 8 es metabólicamente equivalente a unas condiciones de estrés suave. Por consiguiente, con una concentración celular inicial de tan solo 120 CFU/ml, una respuesta de estrés suave provocada únicamente por un cambio ambiental produjo una disminución detectable en el valor de la respuesta de impedancia lo suficientemente fuerte para identificar la presencia de células viables en menos de 30 minutos, demostrando así la sensibilidad del método.

#### **Ejemplo 4: Detección de *E. coli* en orina**

Como ejemplo adicional de la sensibilidad del método, un inóculo de 145 CFU/ml de *E. coli* en una mezcla 1:1 v/v de orina y suspensión de medio TSB se controló en una cámara junto con la mezcla de medio-orina únicamente en la otra. La Fig. 9 muestra un gráfico del Perfil de Respuesta de Impedancia, que consiste en la relación calculada de los dos componentes capacitivos respectivos de las señales de impedancia, junto con un control negativo (solo orina/medio en las dos cámaras) y caracteriza la fase de latencia y el crecimiento posterior que se produce dentro de la suspensión bacteriana.

La "respuesta de impedancia inicial" comprende la disminución del valor del perfil de respuesta de impedancia observado durante los primeros 45 minutos de la medida y es detectable mucho antes. La aparición del aumento de impedancia bien definido en el perfil de respuesta de impedancia corresponde al crecimiento. El punto de inflexión a los 45 minutos, en el que la pendiente del perfil de respuesta de impedancia cambia de una pendiente negativa a una pendiente positiva, corresponde al final de la respuesta de estrés y el comienzo del crecimiento de la población. La respuesta de impedancia inicial refleja una respuesta de estrés suave de las células bacterianas resultante del estrés ambiental después de la transferencia a un nuevo medio (el denominado estrés por "nuevo medio"). Nosotros observamos que estos datos corresponden a la detección de únicamente 4 células bacterianas (estimación estadística) dentro del volumen de ensayo de 28,3 microlitros ( $\mu$ l) utilizado para generar estos datos.

#### **Análisis rápido de la susceptibilidad de una célula a un agente bioactivo**

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar un resultado predictivo de la susceptibilidad de una célula a una concentración seleccionada de un agente bioactivo y un nivel de estrés de la célula a la concentración seleccionada del agente, comprendiendo dicho método: a) i) en momentos específicos o a lo largo de una serie de momentos, medir una respuesta de impedancia inicial de una muestra de ensayo que incluye: la célula, un medio y la concentración seleccionada del agente bioactivo; y medir una respuesta de impedancia de una muestra de referencia que incluye el medio y la concentración seleccionada del agente bioactivo, estando dicha muestra de referencia desprovista de células; ii) determinar un Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia en cada uno de los momentos, consistiendo el Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia en una comparación matemática de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinada en el paso a)(i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso a)(i) en cada momento; iii) opcionalmente, repetir los pasos a)(i) y a)(ii) para múltiples concentraciones seleccionadas del agente bioactivo con el fin de obtener el Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia correspondiente para cada concentración diferente seleccionada del agente bioactivo conocido; b) i) en momentos específicos o a lo largo de una serie de momentos, medir la respuesta de impedancia inicial de una segunda muestra de ensayo que incluye la célula y el medio, estando la segunda muestra de ensayo desprovista del agente bioactivo; y medir la respuesta de impedancia de una muestra de referencia que incluye el medio, estando dicha muestra de referencia desprovista de células; ii) calcular un Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia, consistiendo el Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia en una comparación matemática de la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de ensayo determinada en el paso b) i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso b) i) en cada momento; y c) para cada concentración seleccionada del agente bioactivo, determinar un valor de Respuesta de Impedancia Normalizada, NIR, consistiendo la NIR en un valor numérico determinado mediante un algoritmo que relaciona el valor del Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia obtenido en el paso a) ii), y/o en el paso a) iii), con el valor del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia obtenido en el paso b) ii), de modo que el valor del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia se incorpora en la NIR, y consistiendo el valor NIR determinado en una medida cuantitativa del nivel de estrés de la célula a la concentración seleccionada del agente bioactivo.

Una realización del método arriba descrito se puede caracterizar adicionalmente de la siguiente manera: La comparación matemática del paso a) ii) de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinada en el paso a)(i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso a)(i) en cada momento se elige entre: una relación de la respuesta de impedancia de la muestra de ensayo determinada en el

5 paso a) i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso a) i) en cada momento, y una diferencia entre la respuesta de impedancia de la muestra de ensayo determinada en el paso a) i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso a) i) en cada momento.

Además, en una realización de la invención arriba descrita, el algoritmo utilizado para determinar la NIR se elige entre una relación matemática o una diferencia absoluta entre el valor del Primer Perfil Tratado de Respuesta de

10 Impedancia y el valor del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia.

En otro aspecto más del método para determinar la susceptibilidad a un agente bioactivo, en el que ya se sabe previamente que la célula es susceptible al agente bioactivo, incluyendo el método adicionalmente: repetir los pasos a), b) y c) con una segunda célula que presenta una susceptibilidad desconocida a un agente bioactivo, siendo la segunda célula del mismo tipo que la célula de la que ya se sabe previamente que es susceptible al agente

15 bioactivo, determinando así el valor de Respuesta de Impedancia Normalizada,  $NIR_{UNK}$ , para la célula que presenta una susceptibilidad desconocida al agente bioactivo; comparar el valor  $NIR_{UNK}$  en la concentración seleccionada para la célula que presenta la susceptibilidad desconocida al agente bioactivo con el valor NIR en la concentración seleccionada para la célula de la cepa de la que ya se sabe previamente que es susceptible al agente bioactivo; y, si el valor  $NIR_{UNK}$  en la concentración seleccionada es mayor que el valor NIR en la concentración seleccionada para la

20 célula de la que ya se sabe previamente que es susceptible al agente bioactivo, predecir que la célula que presenta la susceptibilidad desconocida al agente bioactivo es menos susceptible al agente bioactivo en la concentración seleccionada que la célula de la que ya se sabe previamente que es susceptible al agente bioactivo.

En otro aspecto más del método para determinar la susceptibilidad a un agente bioactivo, en el que la célula es de una cepa de la que ya se sabe que es susceptible al agente bioactivo o que se determina que es susceptible a éste, el método comprende adicionalmente: para los momentos específicos o para la serie de momentos, representar en un gráfico, en función del tiempo, el Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia para cada concentración

25 seleccionada diferente del agente bioactivo, y el Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia de la segunda muestra de ensayo que comprende la célula y el medio, estando la segunda muestra de ensayo desprovista del agente bioactivo, obteniendo así una familia de curvas para las concentraciones seleccionadas del agente bioactivo y para la célula no tratada; calcular una pendiente media de cada curva en un momento seleccionado; obtener un valor de pendiente normalizado para cada Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia dividiendo el valor de la pendiente media de cada curva en el momento seleccionado por el valor de la pendiente de la curva del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia; o modificando de otro modo el valor de la pendiente media de cada curva en el momento seleccionado por el valor de la pendiente de la curva del

35 Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia; representar en un gráfico la pendiente normalizada de cada Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia en función de la concentración correspondiente del agente bioactivo, obteniendo así una Curva de Tasa de Cambio Normalizada que puede utilizarse para predecir una concentración efectiva del agente bioactivo para la célula; determinar el valor de la pendiente normalizada para una cepa celular desconocida, y, si el valor de la pendiente normalizada de la cepa celular desconocida está por encima de la Curva de Tasa de Cambio Normalizada de la cepa celular de la que se sabe que es susceptible al agente

40 bioactivo, determinar que la cepa celular desconocida es resistente al agente bioactivo, tal como se determina mediante otros métodos.

A continuación se da un ejemplo no limitativo de un análisis rápido de la susceptibilidad a fármacos.

#### **Ejemplo 4: Medición de Análisis Rápido de Susceptibilidad a Fármacos**

Tal como se ha señalado anteriormente, el cultivo de muestras infecciosas tiene actualmente una larga duración debido al tiempo necesario para que se produzca un crecimiento observable de los constituyentes biológicos, el principal obstáculo para un análisis rápido de la resistencia a fármacos. En lugar de basarse en el crecimiento, el método descrito basado en la impedancia supera este obstáculo para determinar rápidamente la susceptibilidad a fármacos de organismos cultivables y organismos viables pero no cultivables mediante el control de la respuesta de

45 impedancia inicial correspondiente del microorganismo al estrés aplicado durante la exposición a compuestos antimicrobianos. Como una demostración del método se presentan datos de impedancia correspondientes a cepas susceptibles y resistentes de la bacteria de crecimiento lento *Mycobacterium bovis* BCG (*M. bovis*) expuestas a isoniazida (INH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Estos datos muestran que los resultados de susceptibilidad a fármacos, que normalmente requieren muchas semanas utilizando métodos estándar de disposición en placas, se pueden obtener en tan solo cuatro horas. En estos experimentos, un inóculo inicial de  $5 \times 10^8$  CFU/ml de células *M. bovis* suspendidas en un caldo 7H9T (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) se mezcló con una concentración predeterminada de INH y se inyectó en una cámara del cassette. En la cámara adyacente se inyectó una mezcla del mismo caldo con la concentración apropiada del fármaco pero sin células, que se utilizó como referencia.

55

La Fig. 10 muestra un gráfico de perfiles de Respuesta de Impedancia obtenidos de las señales de capacitancia diana y de referencia para cinco concentraciones de fármaco INH (de 0 a 12,5 µg/ml). Cada perfil infiere la respuesta de estrés de la cepa de *M. bovis* sensible y muestra que la respuesta de estrés del organismo varía con la concentración del fármaco y refleja su susceptibilidad al mismo.

- 5 Todas las respuestas han sido escaladas a un valor igual a 1.000 al comienzo. Se observa una familia de curvas que diferencia claramente cambios en la respuesta de estrés de la célula en función de la concentración de fármaco para el compuesto.

#### **Análisis del Ejemplo 4:**

- 10 Cada punto de estas curvas representa el valor de la señal de capacitancia de la suspensión célula-medio-fármaco dividido por el de la mezcla de medio-fármaco en los diferentes momentos de medida. Dado que estos datos están formados como relaciones, la medición de referencia (control) se incorpora automáticamente y los efectos de fondo se reducen al mínimo. En general, la pendiente del Perfil de Respuesta de Impedancia disminuye a medida que aumenta la concentración de fármaco, lo que indica una respuesta de estrés más grande y una reducción correspondiente de la viabilidad celular en comparación con el crecimiento. Esta tendencia se confirmó mediante  
15 recuentos correspondientes en placa obtenidos al final de cada experimento.

- Medida de la Resistencia a Fármacos. En primer lugar se aisló y caracterizó un mutante espontáneo de *M. bovis* resistente a la INH. Esto se llevó a cabo mediante el aislamiento de colonias mutantes de una placa de fármaco 7H10 que contenía un gradiente de concentraciones de INH desde 0 hasta 63 µg INH/ml (equivalente a 0 - 10x  
20 concentración inhibitoria mínima (MIC) de la cepa sensible) y a continuación el recultivo en una segunda placa de fármaco con agar 7H10 fresco que tenía una concentración de 25 µg/ml (4x MIC) de INH. La susceptibilidad al fármaco de este mutante se cuantificó utilizando un método de microdilución en caldo estándar y la MIC correspondiente para INH<sup>R</sup>-4, el mutante seleccionado para las mediciones de impedancia, tenía un valor de aproximadamente 50 µg/ml (8x MIC de la cepa sensible), confirmando su resistencia.

- 25 Se obtuvieron las respuestas de impedancia del mutante resistente desarrollado en presencia o ausencia de un fármaco (12,5 µg/ml INH (2x MIC)) frente a un control (medio que no contenía células). Estas respuestas de impedancia medidas eran idénticas entre sí y también eran similares a las de la cepa sensible desarrollada sin fármaco, tal como muestra la Fig. 10. Además, las curvas son cualitativamente diferentes de la respuesta plana de un control negativo que no contenía células.

- 30 Correlaciones de la Respuesta de Impedancia con la Concentración de Fármaco. Las diferentes respuestas de impedancia representadas en el gráfico de la Fig. 10 se pueden presentar de una forma sucinta que permite una fácil interpretación. Las correlaciones de concentración fármaco-respuesta de impedancia se describen calculando la tasa de cambio relativa en un único momento fijo y representando en un gráfico el resultado en función de la concentración de fármaco correspondiente. Para estos datos, el valor de la respuesta de impedancia para cada curva se obtuvo en tan solo cuatro horas, una fracción del tiempo necesario para multiplicar por dos la población celular de esta especie y mucho antes de que pueda comenzar el crecimiento bacteriano. La pendiente media se  
35 calculó utilizando este valor y el valor de inicio común (es decir, Respuesta de Impedancia = 1.000 Unidades Arbitrarias).

- A continuación, los respectivos valores de estas pendientes se dividieron entre el valor de los datos de crecimiento para obtener valores "normalizados". En la Fig. 11 se representan estos valores finales en un gráfico en función de la  
40 concentración de fármaco. Estos puntos de datos "normalizados" forman parte de una curva de puntos que cuantifica la respuesta de estrés del microorganismo al fármaco y son una representación de su susceptibilidad. Específicamente, la curva de puntos representada en el gráfico de la Fig. 11 describe la respuesta de estrés de la cepa sensible de *M. bovis* (determinada a priori utilizando métodos convencionales) al fármaco INH y sirve como base para una medida predictiva para determinar la susceptibilidad de las células al compuesto antimicrobiano. A  
45 una concentración de fármaco dada, una cepa de *M. bovis* diferente con un valor normalizado medido situado por encima del punto correspondiente de la curva de puntos que representa la respuesta de estrés de una célula susceptible indicaría una resistencia al fármaco; similarmente, un punto situado por debajo del valor estándar indicaría una mayor sensibilidad.

- 50 Por ejemplo, dado que las respuestas de impedancia medidas en el caso del mutante resistente en presencia y ausencia de INH son iguales, el valor "normalizado" de la pendiente es igual a uno que indica que la exposición a 12,5 µg/ml de INH no tiene ninguna influencia en la viabilidad del mutante resistente, lo que concuerda con su umbral de susceptibilidad medido de 8x MIC. El valor de pendiente normalizado para la cepa resistente, INH<sup>R</sup>-4, (Fig. 11 - cuadrado en la parte superior derecha) está muy lejos de la tendencia de los datos correspondientes a la cepa sensible, lo que la identifica como altamente resistente a la INH.

- 55 Estrés y Susceptibilidad. La información de la susceptibilidad al fármaco se obtiene normalmente a partir de múltiples medidas de dilución del fármaco mediante numerosos experimentos de crecimiento de punto único o con un gradiente de difusión. El método aquí descrito obtiene la misma información a partir de múltiples medidas a lo

largo del tiempo, pero utilizando una única concentración de fármaco. Los datos representados en el gráfico de la Fig. 11 demuestran una relación biunívoca entre la concentración de fármaco y el parámetro derivado de la impedancia. Por consiguiente, el cálculo de este parámetro derivado de datos medidos en una serie de momentos, al presentarse en un gráfico en función de la concentración real de fármaco utilizada, representa el nivel de estrés correspondiente que permite deducir la susceptibilidad de la célula al fármaco. Esto se lleva a cabo desarrollando un algoritmo y la compilación de una base de datos para diferentes células y fármacos.

En resumen, las respectivas respuestas de impedancia para las diferentes combinaciones organismo/concentración de fármaco medidas se representaron juntas en un gráfico como una familia de curvas (Fig. 10) que muestra todas las respuestas de estrés correspondientes del organismo tratado. Para producir estas curvas dosis-viabilidad (Fig. 11) se creó y aplicó una parametrización analítica eficiente. La parametrización utilizada es relativa al crecimiento de células no tratadas (obtenidas simultáneamente) para asegurar el control interno de todas las mediciones.

## DetECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN MUESTRAS COMPLEJAS

### Ejemplo 5: Detección de Bacterias en Sangre

Para demostrar la eficacia del método en matrices de muestras complejas se sembraron diferentes especies de bacterias en concentrados de plaquetas humanas (PC) y éstos se sometieron a detección utilizando la plataforma de impedancia BioSense. Cuando se trabaja con muestras complejas se han de tener en cuenta algunos aspectos adicionales. Por ejemplo, en el caso de la sangre, las plaquetas, los leucocitos (WBC) residuales y los eritrocitos (RBC) son metabólicamente activos y consumen oxígeno y/o glucosa, y pueden interferir en la medida de impedancia de la respuesta de estrés bacteriana. Por consiguiente, su presencia se debe reducir al mínimo para asegurar una medición sensible. Además, las bacterias incrustadas en células sanguíneas y/u otras células o adheridas a la superficie de éstas han de ser liberadas para asegurar la detección de todas las bacterias y que no se producen resultados negativos falsos.

En el siguiente ejemplo se aprovecha la fragilidad de las plaquetas y otras células sanguíneas humanas en comparación con cualquier bacteria contaminante. Antes de la detección de la impedancia se añadió un detergente suave a los PC para provocar la lisis de todas las células sanguíneas y al mismo tiempo inducir un estrés metabólico en todas las bacterias contaminantes. Lo primero elimina cualquier interferencia potencial de células humanas metabólicamente activas que podrían contribuir a una señal no deseada; lo segundo proporciona una respuesta de impedancia mensurable que identifica la presencia de bacterias viables en la muestra mediante su respuesta de estrés específica. Una vez completa la lisis, la suspensión se pasó a través de filtros diseñados para permitir el paso y para obstruir el paso de bacterias para las muestras diana y de referencia, respectivamente.

Este protocolo aborda todas las consideraciones esenciales para un ensayo práctico. Por ejemplo, la eficiencia del filtrado de *S. epidermidis* después de la lisis se midió con un resultado de aproximadamente un 100 por ciento con nuestro protocolo. En comparación, *Orlando* y *col.* midieron la transmisión de *S. epidermidis* después de filtrar concentrados plaquetarios similares con reducción de leucocitos pero no sometidos a lisis obteniendo sólo un resultado de aproximadamente un 50 por ciento, lo que indica la eficacia y ventaja de nuestro método.

Experimentos con PC Sembrados. Unas unidades frescas de PC se sembraron con nuestra bacteria modelo, se estresaron y filtraron, y se midieron las respectivas Respuestas de Impedancia. También se obtuvieron unidades frescas de PC y una muestra de 2 ml se sometió a lisis con adición de PBS en lugar de la siembra bacteriana. Después, el producto de lisis se diluyó con BHI (1:1 v/v) y se pasó a través de un filtro de jeringuilla de 5 µm para tamizar fragmentos grandes y posibles aglutinamientos de plaquetas, pero no bacterias. Una parte de este filtrado se pasó a través de un filtro de jeringuilla de 2 µm para eliminar todas las células bacterianas. Las dos cámaras de detección del cassette se cargaron con las muestras respectivas y se registraron las señales de capacitancia. Los gráficos de la Fig. 12 muestran la Respuesta de Impedancia de línea base plana de los productos de lisis de PCV que no contenían bacterias (curva roja con la leyenda "Control Negativo"). El leve aumento de la respuesta de impedancia observado durante los primeros 5 minutos se atribuye a diferencias térmicas entre las dos cámaras.

La parte restante del PC se utilizó para sembrarla con la bacteria modelo. En cada caso se obtuvieron siembras del orden de  $10^3$  CFU/ml. Inmediatamente después de la siembra, se aplicó el protocolo de lisis/filtración descrito y se cargaron las cámaras de detección del cassette. El cassette se insertó en el analizador de temperatura controlada, se registraron las capacitancias de las dos cámaras y se calculó la Respuesta de Impedancia. El número de células bacterianas iniciales y finales se contó utilizando métodos estándar de disposición en placas y las CFU eran coherentes con la ausencia de una pérdida estadísticamente significativa de los títulos o la viabilidad.

La Fig. 12A, 12B y 12C muestran gráficos de las respuestas de impedancia inicial de *Escherichia coli* gram-negativa ( $4 \times 10^3$  CFU/ml), *Staphylococcus epidermidis* gram-positiva ( $3,2 \times 10^3$  CFU/ml), y el *Propionibacterium acnes* anaerobio gram-positivo de crecimiento lento ( $2,8 \times 10^3$  CFU/ml), respectivamente, junto con el mismo control negativo. Los valores de la respuesta de impedancia medidos de las tres bacterias expuestas al estresor se diferencian claramente de la respuesta de impedancia plana de los datos de control negativo y su magnitud

disminuye de forma continua, estableciendo una tendencia inequívoca fácilmente detectable en un plazo de 15 minutos.

- 5 El breve aumento en las respuestas de *S. epidermis* y *P. acnes* antes del comienzo de la disminución se atribuye de nuevo a diferencias térmicas antes del equilibrio y es evidente porque las magnitudes de las señales están cuantitativamente más cerca en la escala con la del control negativo en comparación con la respuesta de la *E. coli* altamente estresada. Es importante señalar que, dado que la *E. coli* es altamente susceptible a una mala supervivencia en plasma, se aisló un cultivo sometido secuencialmente a tres ciclos en plaquetas diferentes y éste se utilizó para asegurar una supervivencia adaptada de esta bacteria en PC.

Las siguientes observaciones se extraen de una comparación de los datos correspondientes a los tres organismos:

- 10 Las Respuestas de Impedancia de las tres especies bacterianas son cualitativamente similares, con valores decrecientes, y bien diferenciadas de la respuesta plana del control negativo (sobrenadante de PC no sembrado).

La Respuesta de Impedancia de microorganismos estresados en una muestra compleja es cualitativamente similar a la de microorganismos estresados en medios convencionales.

- 15 El método funciona igualmente bien en la detección de bacterias anaeróbicas (*P. acnes*) que en la detección de especies aeróbicas (*S. epidermidis*) o anaeróbicas facultativas (*E. coli*).

Todas las respuestas proporcionan inmediatamente resultados definitivos en un plazo entre 10 y 30 minutos independientemente del tiempo real necesario para multiplicar por dos la población del microorganismo, lo que subraya que nuestro método de detección es un método verdaderamente rápido.

- 20 Las Respuestas de Impedancia de las tres bacterias diferentes son cuantitativamente diferentes. Nosotros sugerimos que estas diferencias resultan de i.) diversas respuestas metabólicas de las diferentes especies, ii) cantidades variables de células bacterianas, iii) diferente sensibilidad al estresor utilizado en el estudio, y iv) variaciones entre un cassette y otro que conducen a diferentes ganancias de señal.

- 25 Se describen aquí diversos kits para facilitar la realización de la metodología de acuerdo con diversas realizaciones. Una realización de un kit descrito es útil para detectar con rapidez, de acuerdo con el método indicado, la presencia o ausencia de una célula en una muestra de ensayo de un medio. El kit incluye: al menos un estresor del que se sabe previamente que provoca una respuesta de estrés en la célula, si la célula está presente en la muestra de ensayo; y un conjunto de instrucciones para utilizar los componentes del kit de acuerdo con el método de la reivindicación 6 para detectar la presencia o ausencia de la célula en la muestra de ensayo.

- 30 También se describe otro kit para determinar la presencia o ausencia de una célula viable dentro de una muestra de ensayo. El kit incluye: a) un medio a partir del cual se puede preparar una suspensión de una muestra de ensayo y un estresor para análisis; y b) un conjunto de instrucciones para utilizar los componentes del kit de acuerdo con el método de la reivindicación 14 para determinar el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo y el estresor, un resultado predictivo de la viabilidad de la célula, y un nivel de estrés de la célula a la concentración seleccionada del agente biológico.

- 35 Otro kit dado a descrito facilita la determinación, de acuerdo con un método indicado, de la susceptibilidad de una célula a una concentración seleccionada de un agente bioactivo y un nivel de estrés de la célula a la concentración seleccionada del agente bioactivo. El kit para determinar la susceptibilidad incluye: a) un medio a partir del cual se puede preparar una suspensión de una muestra de ensayo de la célula y una suspensión de cada concentración del agente bioactivo para análisis; y b) un conjunto de instrucciones para utilizar los componentes del kit de acuerdo con el método indicado, y para determinar un nivel de estrés de una célula con la concentración seleccionada del agente biológico.
- 40

**REIVINDICACIONES**

1. Método para controlar rápidamente una respuesta de estrés de una célula suspendida en un medio a un estresor y determinar la magnitud de la respuesta de estrés, comprendiendo dicho método:
- 5 a) bajo condiciones adecuadas para controlar la tensión y/o la corriente, aplicar un campo eléctrico a una muestra de ensayo que comprende la célula suspendida en el medio o a una muestra de ensayo que comprende la célula sobre una perla de microcultivo suspendida;
- b) controlar la tensión y/o la corriente;
- 10 c) permitir que un estresor afecte a la muestra de ensayo, eligiéndose el estresor entre un estresor aplicado antes de la aplicación del campo eléctrico, un estresor aplicado esencialmente de forma simultánea con dicha aplicación del campo eléctrico y un estresor aplicado después de la misma;
- d) controlar una respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo, consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en un cambio de impedancia de la muestra de ensayo durante el período de transición desde una primera medición de la impedancia de la muestra de ensayo aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento, controlando así la respuesta de estrés de dicha célula al estresor; y
- 15 e) determinar el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo, siendo el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo una indicación de la magnitud de la respuesta de estrés de la célula, determinándose la magnitud de la respuesta de estrés de la célula al estresor;
- 20 comprendiendo dicho método adicionalmente: comparar matemáticamente el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinado en el paso (e) con:
- (i) un primer valor estándar que representa la respuesta de impedancia de una primera muestra de referencia que incluye el medio con o sin el estresor, estando la primera muestra de referencia desprovista de células; y/o
- 25 (ii) un segundo valor estándar que representa la respuesta de impedancia inicial de una segunda muestra de referencia que incluye una célula y el medio, siendo la célula de la muestra de referencia del mismo tipo y estando presente en la misma concentración que la célula en la muestra de ensayo, y estando la muestra de referencia desprovista del estresor; y determinar un valor para un Primer Perfil de Respuesta de Impedancia de la muestra de ensayo, estando basado el valor del Primer Perfil de Respuesta de Impedancia en la comparación matemática del nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinado en el paso (e) con el primer valor estándar y/o el segundo valor estándar,
- 30 determinándose la respuesta de impedancia inicial mediante un control dentro de un período de aproximadamente 45 minutos desde la primera medida de impedancia.
- 35 2. Método para detectar rápidamente la presencia o ausencia de una célula mediante el control de una respuesta de estrés de la célula si ésta está presente, o la ausencia de la respuesta de estrés si dicha célula no está presente o está muerta, comprendiendo dicho método:
- 40 a) bajo condiciones adecuadas para controlar la tensión y/o la corriente, aplicar un campo eléctrico a una muestra de ensayo que comprende la célula suspendida en un medio o a una muestra de ensayo que comprende la célula sobre una perla de microcultivo suspendida;
- b) controlar la tensión y/o la corriente;
- c) permitir que un estresor afecte a la muestra de ensayo, eligiéndose el estresor entre un estresor aplicado antes de la aplicación del campo eléctrico, un estresor aplicado esencialmente de forma simultánea con dicha aplicación del campo eléctrico y un estresor aplicado después de la misma;
- 45 d) en un momento específico o a lo largo de una serie de momentos, medir una respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo, consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en un cambio de impedancia de la muestra de ensayo durante el período de transición desde una primera medición de la impedancia de la muestra de ensayo aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento; y
- 50

- e) evaluar el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en cada momento, siendo el nivel de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo en cada momento una indicación del nivel de la respuesta de estrés de dicha célula, con lo que se controla la respuesta de estrés de dicha célula al estresor si dicha célula está presente en la muestra de ensayo, o la ausencia de la respuesta de estrés si dicha célula no está presente en la muestra de ensayo o si está muerta; y de este modo detectar rápidamente la presencia o ausencia de dicha célula en la muestra de ensayo;
- 5
- comprendiendo dicho método adicionalmente confirmar la presencia o ausencia de dicha célula en la muestra de ensayo mediante:
- (i) medir una respuesta de impedancia de una primera muestra de referencia que incluye el medio con o sin el estresor, estando la primera muestra de referencia desprovista de células; y/o
- 10
- (ii) medir una respuesta de impedancia inicial de una segunda muestra de referencia que incluye dicha célula y el medio, estando dicha célula en la misma concentración que la célula en la muestra de ensayo, y estando la segunda muestra de referencia desprovista del estresor; y consistiendo la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de referencia en un cambio de impedancia de la segunda muestra de referencia durante el período de transición desde una primera medida de la impedancia de la segunda muestra de referencia aproximadamente en el momento de la aplicación del campo eléctrico hasta e inclusive una impedancia de la muestra de ensayo medida posteriormente, que es indicativa de la respuesta de estrés o ausencia de crecimiento;
- 15
- (iii) determinar un valor para un Perfil de Respuesta de Impedancia mediante la comparación de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo obtenida en el paso (d) con la respuesta de impedancia de la primera muestra de referencia y/o la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de referencia; y
- 20
- (iv) evaluar la comparación del paso (iii), confirmando así la presencia o ausencia de dicha célula en la muestra de ensayo,
- 25
- determinándose la respuesta de impedancia inicial mediante un control dentro de un período de aproximadamente 45 minutos desde la primera medida de impedancia.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el estresor aplicado a la célula comprende poner en contacto la célula con un agente bioactivo conocido; opcionalmente seleccionándose el agente bioactivo conocido de entre un agente farmacéuticamente activo, un agente anticanceroso; una toxina biológica; un virus; y otra sustancia capaz de producir estrés, y combinaciones de éstos.
- 30
4. Método para determinar un resultado predictivo de la susceptibilidad de una célula suspendida en un medio a una concentración seleccionada de un agente bioactivo y un nivel de estrés de la célula con la concentración seleccionada del agente bioactivo, siendo el nivel de susceptibilidad de la célula previamente conocido o desconocido, comprendiendo dicho método:
- 35
- a) i) en momentos específicos o a lo largo de una serie de momentos, medir una respuesta de impedancia inicial de una muestra de ensayo que incluye la célula suspendida en un medio o de una muestra de ensayo que incluye la célula sobre una perla de microcultivo suspendida, y la concentración seleccionada del agente bioactivo; y medir una respuesta de impedancia de una muestra de referencia que incluye el medio y la concentración seleccionada del agente bioactivo, estando dicha muestra de referencia desprovista de células, y midiéndose la respuesta de impedancia inicial dentro de un período de aproximadamente 45 minutos de los minutos iniciales de la medida;
- 40
- ii) determinar un Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia en cada uno de los momentos, consistiendo el Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia en una comparación matemática de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinada en el paso a)(i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso a)(i) en cada momento;
- 45
- iii) opcionalmente, repetir los pasos a)(i) y a)(ii) para múltiples concentraciones seleccionadas del agente bioactivo con el fin de obtener el Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia correspondiente para cada concentración diferente seleccionada del agente bioactivo conocido;
- 50
- b) i) en momentos específicos o a lo largo de una serie de momentos, medir la respuesta de impedancia inicial de una segunda muestra de ensayo que incluye la célula suspendida en el medio o que incluye la célula sobre una perla de microcultivo suspendida, estando la segunda muestra de ensayo desprovista del agente bioactivo; y medir la respuesta de impedancia de una muestra de referencia que incluye la célula suspendida en el medio o que incluye la célula sobre una perla de microcultivo suspendida, estando dicha muestra de referencia desprovista de células;

ii) calcular un Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia, consistiendo el Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia en una comparación matemática de la respuesta de impedancia inicial de la segunda muestra de ensayo determinada en el paso b) i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso b) i) en cada momento; y

5 c) para cada concentración seleccionada del agente bioactivo, determinar un valor de Respuesta de Impedancia Normalizada, NIR, consistiendo la NIR en un valor numérico determinado mediante un algoritmo que relaciona el valor del Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia obtenido en el paso a) ii), y/o en el paso a) iii), con el valor del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia obtenido en el paso b) ii), de tal modo que el valor del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia se incorpora en la NIR, y consistiendo el valor NIR determinado en una medida cuantitativa del nivel de estrés de la célula a la concentración seleccionada del agente bioactivo.

10 5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque la comparación matemática del paso a) ii) de la respuesta de impedancia inicial de la muestra de ensayo determinada en el paso a)(i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso a)(i) en cada momento se elige entre:

15 una relación de la respuesta de impedancia de la muestra de ensayo determinada en el paso a) i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso a) i) en cada momento, y

20 una diferencia entre la respuesta de impedancia de la muestra de ensayo determinada en el paso a) i) y la respuesta de impedancia de la muestra de referencia determinada en el paso a) i) en cada momento.

6. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque el algoritmo utilizado para determinar la NIR se elige entre una relación matemática o una diferencia absoluta entre el valor del Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia y el valor del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia.

25 7. Método según la reivindicación 4, donde ya se sabe previamente que la célula es susceptible al agente bioactivo, incluyendo el método adicionalmente:

30 repetir los pasos a), b) y c) con una segunda célula que presenta una susceptibilidad desconocida a un agente bioactivo, siendo la segunda célula del mismo tipo que la célula de la que ya se sabe previamente que es susceptible al agente bioactivo, determinando así el valor de Respuesta de Impedancia Normalizada,  $NIR_{UNK}$ , para la célula que presenta una susceptibilidad desconocida al agente bioactivo; comparar el valor  $NIR_{UNK}$  en la concentración seleccionada para la célula que presenta la susceptibilidad desconocida al agente bioactivo con el valor NIR en la concentración seleccionada para la célula de la cepa de la que ya se sabe previamente que es susceptible al agente bioactivo; y, si el valor  $NIR_{UNK}$  en la concentración seleccionada es mayor que el valor NIR en la concentración seleccionada para la célula de la que ya se sabe previamente que es susceptible al agente bioactivo, predecir que la célula que presenta la susceptibilidad desconocida al agente bioactivo es menos susceptible al agente bioactivo en la concentración seleccionada que la célula de la que ya se sabe previamente que es susceptible al agente bioactivo.

35 8. Método según la reivindicación 4, donde la célula es de una cepa de la que ya se sabe que es susceptible al agente bioactivo o que se determina que es susceptible a éste, que comprende adicionalmente:

40 para los momentos específicos o para la serie de momentos, representar en un gráfico, en función del tiempo, el Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia para cada concentración seleccionada diferente del agente bioactivo, y el Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia de la segunda muestra de ensayo que comprende la célula y el medio, estando la segunda muestra de ensayo desprovista del agente bioactivo, obteniendo así una familia de curvas para las concentraciones seleccionadas y para la célula no tratada;

45 calcular una pendiente media de cada curva en un momento seleccionado;

50 obtener un valor de pendiente normalizado para cada Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia dividiendo el valor de la pendiente media de cada curva en el momento seleccionado entre el valor de la pendiente de la curva del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia; o modificando de otro modo el valor de la pendiente media de cada curva en el momento seleccionado con el valor de la pendiente de la curva del Primer Perfil No Tratado de Respuesta de Impedancia;

representar en un gráfico la pendiente normalizada de cada Primer Perfil Tratado de Respuesta de Impedancia en función de la concentración correspondiente del agente bioactivo, obteniendo así una Curva

de Tasa de Cambio Normalizada que puede ser utilizada para predecir una concentración efectiva del agente bioactivo para la célula;

- 5 determinar el valor de pendiente normalizado para una cepa celular desconocida, y, si el valor de pendiente normalizado de la cepa celular desconocida está por encima de la Curva de Tasa de Cambio Normalizada de la cepa celular de la que se sabe que es susceptible al agente bioactivo, determinar que la cepa celular desconocida es resistente al agente bioactivo, tal como se determina mediante otros métodos.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la célula se elige entre una célula procariota o una célula eucariota.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque
- 10 (a) la célula es una célula eucariota seleccionada entre protistas, hongos, una célula humana no transformada, una célula animal no transformada, una célula humana transformada, una célula animal transformada, con la condición de que, si la célula eucariota es dependiente de la adhesión, el medio de la muestra de ensayo comprende adicionalmente perlas de microcultivo suspendidas que incluyen un revestimiento de una matriz extracelular capaz de adherirse a la célula eucariota; o
- 15 (b) la célula es una célula procariota o eucariota, el medio de la muestra de ensayo y el medio de la muestra de referencia comprenden adicionalmente perlas suspendidas que incluyen un revestimiento de receptores específicos capaces de adherirse a las células procariotas o eucariotas; pudiendo comprender los receptores opcionalmente componentes biológicamente activos seleccionados entre: componentes generados a partir de respuestas inmunológicas, componentes generados a partir de ácidos nucleicos y
- 20 componentes generados a partir de otros compuestos químicos o bioquímicos que pueden ser utilizados para identificar células específicas.

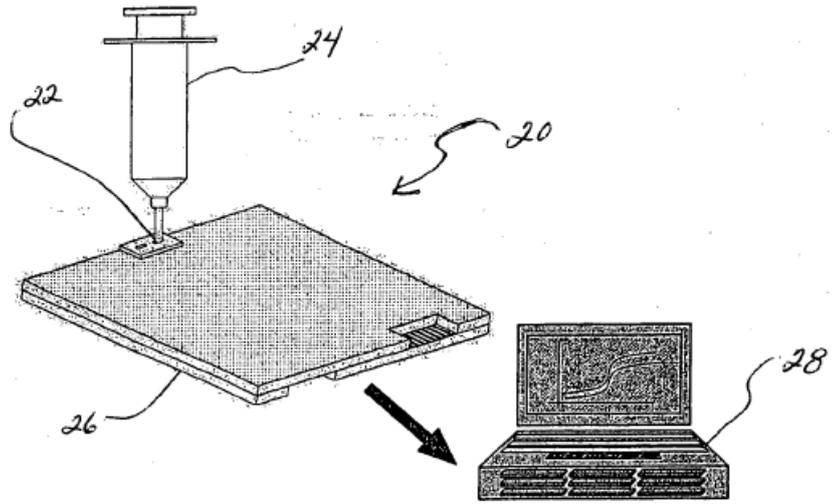


Fig. 1

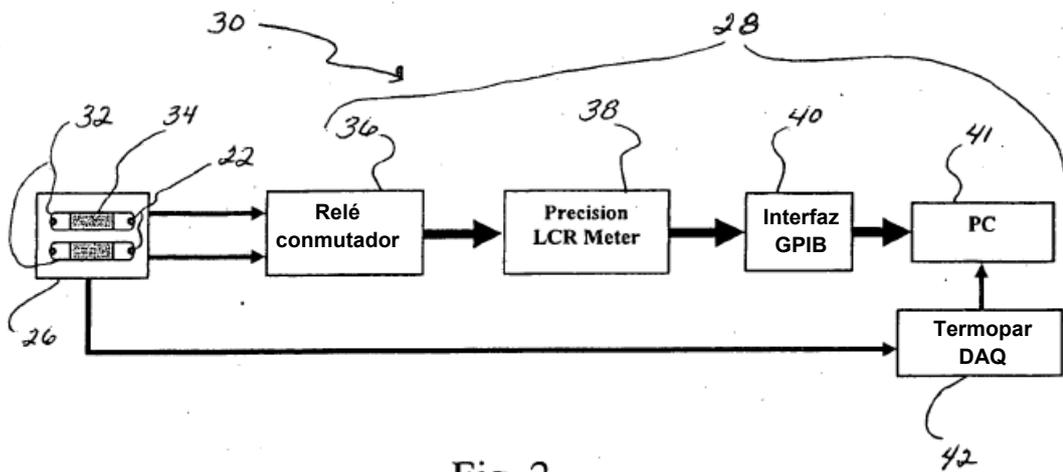


Fig. 2

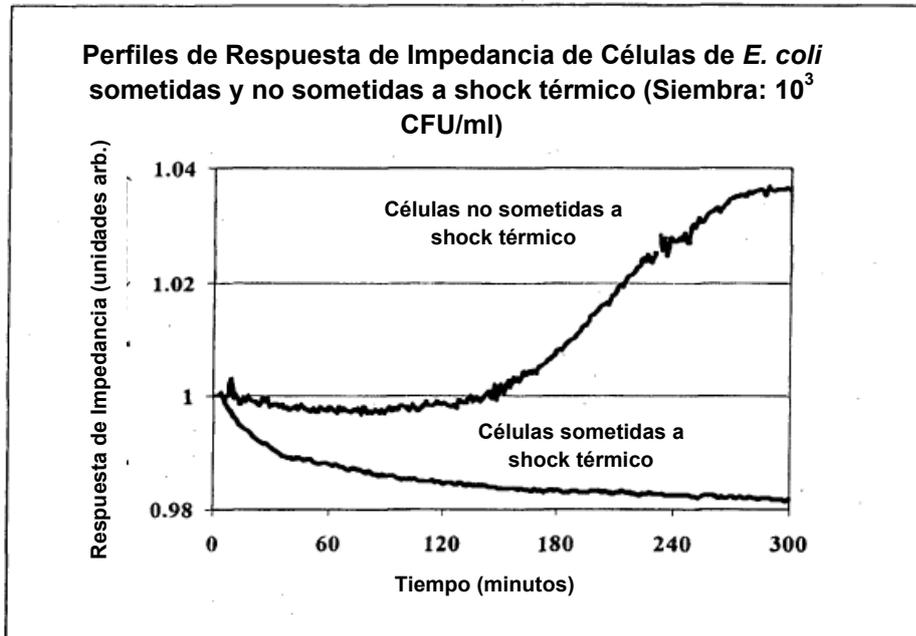


Fig. 3

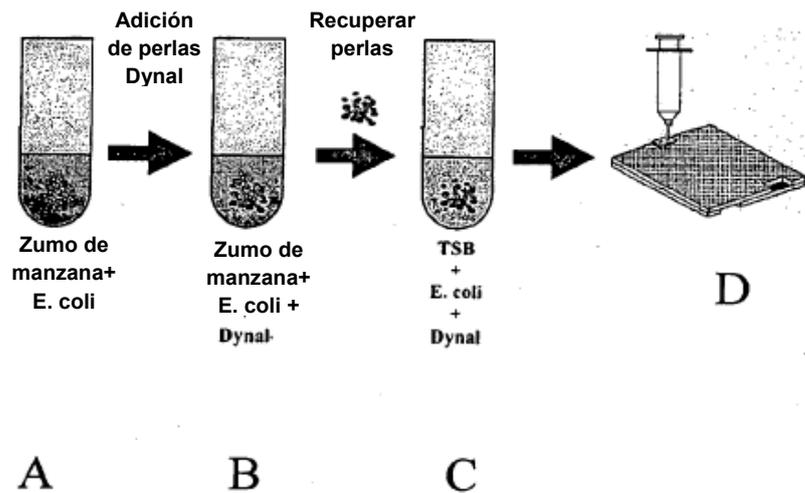


Fig. 4A – Fig. 4D

Detección de *E. coli* capturada de zumo de manzana (~ 10<sup>3</sup> CFU/ml)

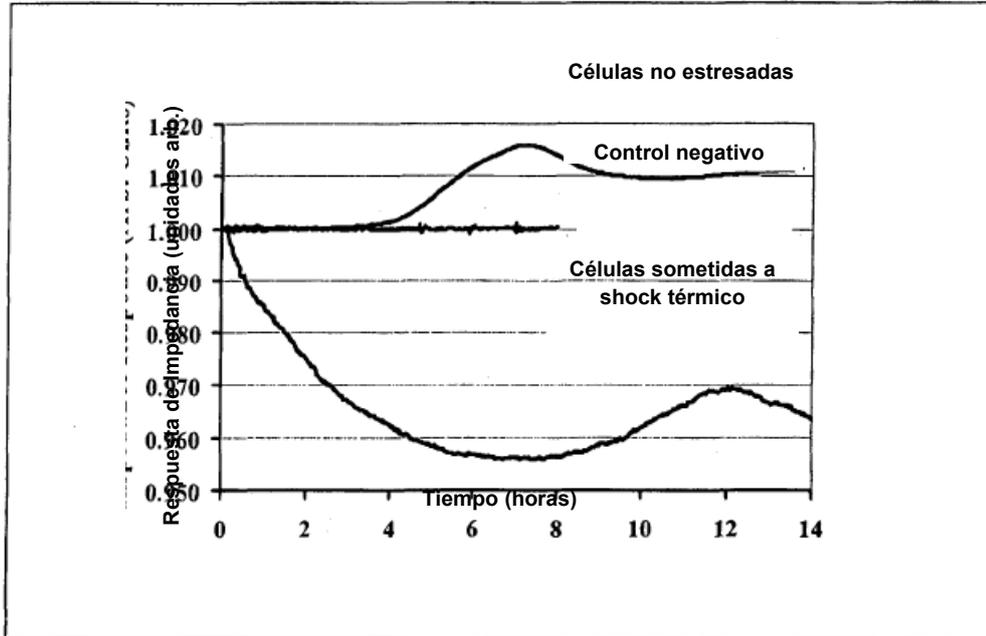


Fig. 5

Perfil de Respuesta de Impedancia de *E. coli* sometida a shock térmico capturada de zumo de manzana

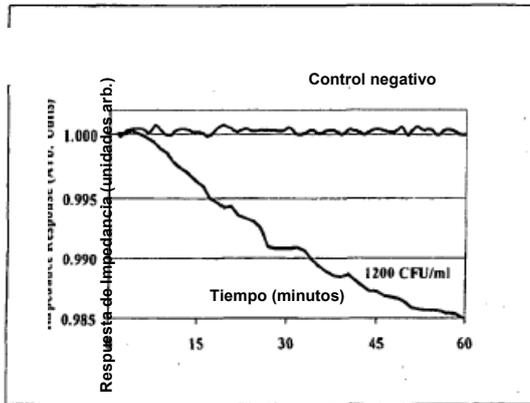


Fig. 6

Perfil de Respuesta de Impedancia de *E. coli* sometida a shock térmico capturada de zumo de manzana

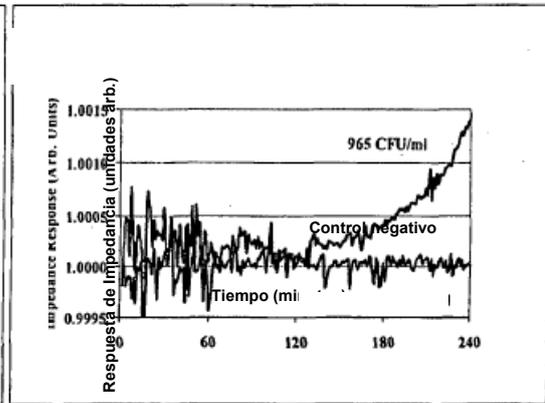


Fig. 7

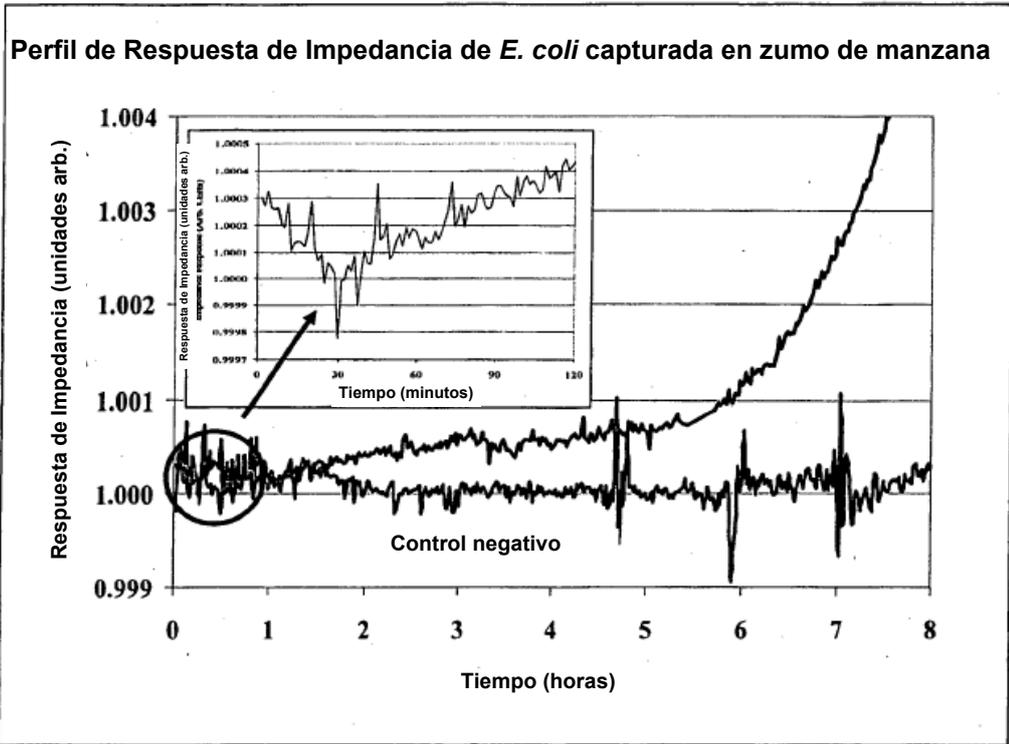


Fig. 8

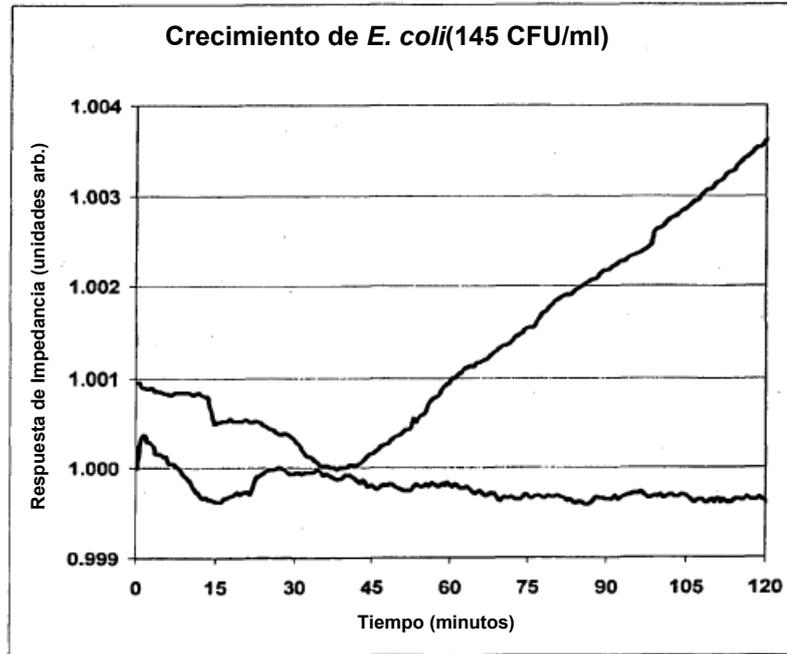


Fig. 9

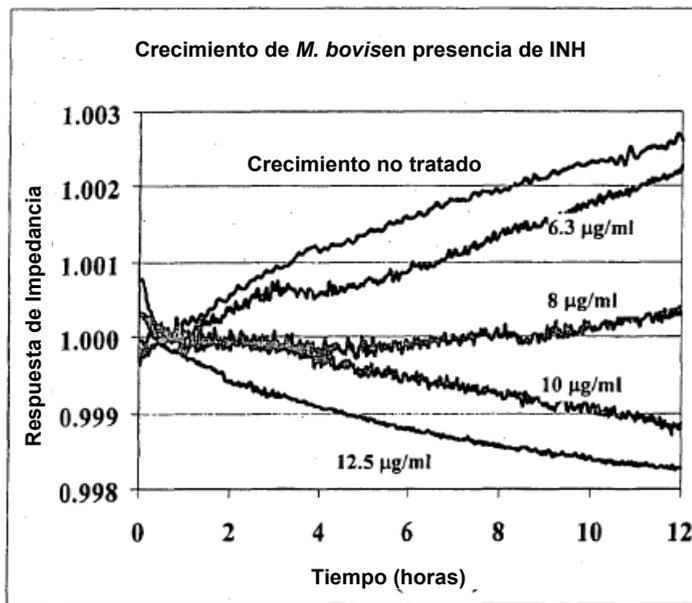


Fig. 10

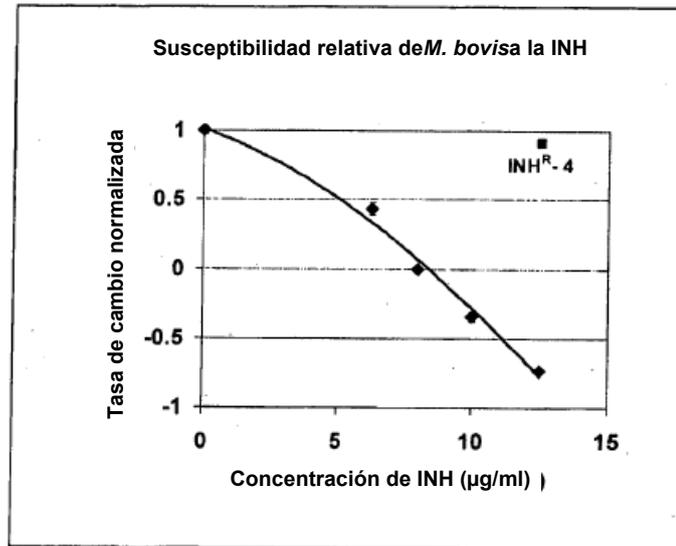


Fig. 11

Fig. 12A

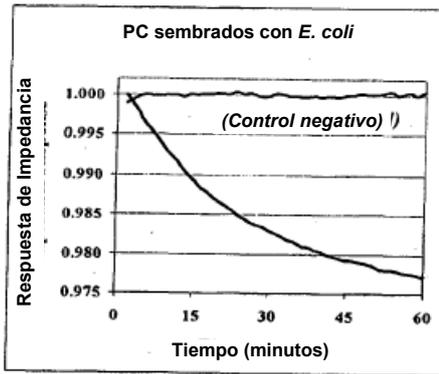


Fig. 12B

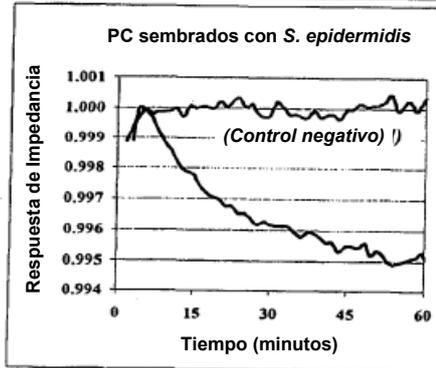


Fig. 12C

