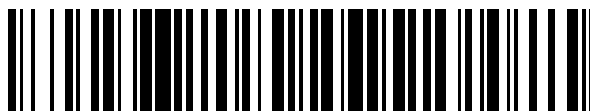


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 130**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/02** (2006.01)

**G01N 33/483** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11815510 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2655652**

54 Título: **Método para medir la resistencia de las películas**

30 Prioridad:

**21.12.2010 FR 1060960**

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

**01.10.2015**

73 Titular/es:

**BIOFILM CONTROL (100.0%)  
Biopole Clermont-Limagne  
63360 Saint Beauzire, FR**

72 Inventor/es:

**BERNARDI, THIERRY;  
MAYER, PASCAL y  
GROELLY, JÉRÔME**

74 Agente/Representante:

**POINDRON, Cyrille**

**ES 2 547 130 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para medir la resistencia de las películas.

### 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir el impacto de una acción sobre una película. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para medir el efecto de una acción, por ejemplo, una acción mecánica, hidrodinámica, física, química o biológica, sobre la integridad de una película.

10

La presente invención encuentra aplicación especialmente en el campo de la biología, la química y la biotecnología.

En la descripción a continuación, las referencias entre corchetes (**[Ref.]**) se refieren a la lista de referencias que se presenta al final del texto.

15

### Técnica anterior

Existen una multitud de depósitos o capas delgadas de sustancias (biológicas) inertes o vivas unidas a soportes: por ejemplo pinturas, barnices, películas compuestas por macromoléculas, biopelículas de microorganismos y diversas células, por ejemplo bacterias, levaduras, algas y las células de organismos pluricelulares. A continuación, estas capas y depósitos sobre un soporte se denominarán por el término "película".

20

Entre estas películas, se forman gradualmente un gran número con el tiempo, por ejemplo por polimerización de monómeros, por agregación o interpenetración de macromoléculas, por el crecimiento de biopelículas de microorganismos, por multiplicación celular y/o producción de sustancias que unen las células entre sí.

25

Esta formación con frecuencia puede ajustarse mediante diversos parámetros físicos o sustancias, cuyo impacto es útil de conocer. Una película también puede modificarse después de su formación por la acción de un tratamiento fisicoquímico, por ejemplo, mediante detergentes, disolventes, radiación, por ejemplo, acción térmica, etc.

30

Todas estas acciones pueden dar como resultado películas para las que puede ser interesante conocer la resistencia a una acción hidrodinámica, tal como un chorro, una corriente o la agitación de una solución que recubre la película. Por ejemplo, también es posible interesarse simplemente por saber si esta película ha sido aún capaz de formarse o si se ha quebrado. En el resto de este documento, estas propiedades se denominarán por el término "integridad".

35

Los procedimientos conocidos hacen posible comparar la integridad de las películas de diversas naturalezas, obtenidas mediante diversos métodos de formación y resultantes de diversos tratamientos.

40

Por ejemplo, en uno de los procedimientos conocidos, se usa un soporte, cuyo color es diferente al de la película. Por lo tanto, cuando las películas se forman en este soporte, es fácil para un experto en la técnica medir la integridad del mismo después de, por ejemplo, una acción hidrodinámica, un tratamiento fisicoquímico y/o un ajuste de su formación mediante el análisis de una imagen adquirida.

45

Sin embargo, también existen películas que son transparentes o que no pueden colorearse, por ejemplo, películas vivas, películas formadas por microorganismos, películas resultantes de la polimerización o agregación para las cuales la sustancia usada para la coloración puede interferir con su formación.

50

Existen procedimientos en la técnica anterior para medir la integridad de una película, por ejemplo, a partir de sus propiedades físicas, tales como su índice de refracción, por ejemplo, en Singh y col., *Physica Scripta*. Vol. 65, 167-180 (2002): "Refractive Index Measurement and its Applications" [Ref. 1] y en Vôrôs y col., *Biophysical Journal*, Vol. 87, 553-561 (2004): "The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers" [Ref. 2].

55

Sin embargo, estos procedimientos son procedimientos costosos que requieren personal preparado y cualificado y también instrumentos sofisticados y costosos.

Hay situaciones, por ejemplo en el campo médico o el campo biológico, en las que es necesario medir la integridad de un gran número de películas diferentes en presencia de compuestos químicos, moléculas biológicas, modificaciones termodinámicas, etc. Por ejemplo, puede ser una cuestión de evaluar la eficacia de un compuesto

sobre biopelículas o bien la acción, por ejemplo, la degradación, modificación o eficacia, de una enzima en una película polimérica.

5 En estas situaciones, por ejemplo, en el caso de realizaciones de cribado de moléculas o enzimas que son activas contra biopelículas, por ejemplo, para evaluar la eficacia de antibióticos sobre películas en el contexto de la atención sanitaria, las técnicas que se han descrito previamente no son satisfactorias ya que no permiten que un experto en la técnica realice las mediciones a un ritmo suficientemente alto.

10 Además, los procedimientos conocidos requieren el uso de un gran número de instrumentos que no pueden usarse simultáneamente en un procedimiento de cribado. Además, los instrumentos usados son costosos, y requieren la presencia de personal cualificado.

15 Además, el tiempo para obtener los resultados con los procedimientos conocidos es muy largo y puede requerir la adición de reactantes que sean capaces de modificar el resultado y, por lo tanto, de conducir a una variabilidad de los resultados y la falta de reproducibilidad de los mismos.

20 Por lo tanto, existe la necesidad real de encontrar un procedimiento para medir el efecto de una acción sobre una película que supere estos fallos, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior, en particular un procedimiento que haga posible controlar el tiempo, reducir la instrumentación necesaria para este procedimiento, reducir los costes y mejorar la detección del efecto.

25 El documento Journal of Microbiological methods, vol. 68, Nº 3, página 605-612, 2007, XP 005892101, ISSN 0167-7012 desvela un dispositivo y un método para la evaluación rápida de la formación de una biopelícula potencial por una bacteria que comprende el uso de partículas magnéticas y la aplicación de una fuerza magnética.

El documento FR 2 916 761 desvela un método para determinar la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico capaz de inhibir el desarrollo de una biopelícula que comprende también el uso de partículas magnéticas y la aplicación de una resistencia magnética.

30 Ninguno de estos documentos desvela el reagrupamiento de las partículas sobre una superficie sumergida antes de la formación de la biopelícula.

### Descripción de la invención

35 El procedimiento de la presente invención hace posible resolver los fallos, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior que se han mencionado anteriormente.

40 En particular, un objeto de la presente invención es un procedimiento para medir el efecto de al menos una acción sobre una biopelícula que comprende las siguientes etapas:

- a. introducir, en una solución, al menos una sustancia capaz de formar una película,
- b. introducir, en la solución obtenida en (a), al menos dos partículas, reposando dichas partículas sobre una superficie sumergida S en dicha solución,
- 45 c. reagrupar las partículas sobre dicha superficie sumergida S, formando dichas partículas sobre dicha superficie un punto o una mancha,
- d. formar dicha película de dicha sustancia,
- e. observar el punto o mancha sobre la superficie S,
- f. aplicar una acción mecánica y/o física a dicha solución,
- 50 g. observar el efecto sobre la película de la acción aplicada en la etapa (e) observando el punto o mancha sobre la superficie S, y
- h. determinar el efecto de la acción aplicado a la película comparando las observaciones de las etapas que se han mencionado anteriormente (e) y (g).

55 De acuerdo con la invención, una sustancia capaz de formar una película puede ser, por ejemplo, microorganismos, alimentos, sustancias químicas, macromoléculas sintéticas, macromoléculas biológicas, coloides y emulsiones, objetos de tamaño microscópico y objetos de tamaño nanoscópico.

Estos pueden ser, por ejemplo, células eucariotas, por ejemplo, células eucariotas animales, por ejemplo células sanguíneas, por ejemplo, leucocitos, por ejemplo granulocitos, leucocitos neutrófilos; leucocitos eosinófilos;

leucocitos basófilos; linfocitos B, linfocitos T, linfocitos NK, monocitos, eritrocitos, trombocitos. También pueden ser células eucariotas vegetales, por ejemplo, células epidérmicas vegetales, células de xilema, células del floema, células del parénquima, células de colénquima y células de esclerénquima. También pueden ser hongos o levaduras. Pueden ser, por ejemplo, *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Pityrosporum*, *Pneumocystis*,  
 5 *Epidermophyton*, *Microsporium*, *Trichophyton*. También pueden ser protozoos, por ejemplo, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba castellanii*, *Naegleria fowleri*.

También pueden ser células procariotas, por ejemplo, cualquier bacteria conocida por un experto en la técnica, por ejemplo las bacterias incluidas en el grupo, si limitación, que consisten en *Acetobacter aurantius*, *Actinobacillus*  
 10 *actinomycetemcomitans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Branhamella catarrhalis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*,  
 15 *Calymmatobacterium granulomatis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium welchii*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium fusiforme*, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus maloratus*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus pertussis*, *Haemophilus vaginalis*, *Helobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Methanobacterium extroquens*, *Microbacterium multifforme*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium diphtheriae*,  
 25 *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella tularensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia*, *Rhizobium radiobacter*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia mooseri*, *Rickettsia psittaci*, *Rickettsia quintana*,  
 30 *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia trachomae*, *Rochalimaea henselae*, *Rochalimaea quintana*, *Rothia dentocariosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus gallinarum*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio comma*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Xanthomonas maltophilia*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis*, etc.

40 La expresión coloídes y emulsiones pretender referirse a una sustancia en forma líquida o semi-sólida que contiene partículas lo suficientemente pequeñas para que la mezcla sea homogénea. Puede ser cualquier coloide y emulsión conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo, puede ser cualquier sustancia y/o composición que comprenda dos fases distintas. Por ejemplo, puede ser un líquido que contenga, en suspensión, partículas, por ejemplo, liposomas, gotas, agregados, que pueden tener un tamaño de partícula por ejemplo 2 a 200 nanómetros, por  
 45 ejemplo de 201 nm a 5 µm. Por ejemplo, puede ser nanoemulsiones, leche, nata, mantequilla, mayonesa, crema hidratante, arcillas, oro coloidal o plata coloidal y emulsiones sintéticas de aceite en agua, ferrofluido en agua y agua en aceite.

De acuerdo con la invención, la expresión macromoléculas sintéticas se entiende que se refiere a moléculas  
 50 modificadas químicas y/o naturales con un elevado peso molecular, por ejemplo un peso de 1 a 1000 kDa, por ejemplo sulfonato de poliestireno y polietilenglicol.

De acuerdo con la invención, la expresión macromoléculas biológicas se entiende que se refiere a cualquier macromolécula biológica con un alto peso molecular, por ejemplo un peso de 5 a 1000 kDa. Por ejemplo, pueden ser  
 55 macromoléculas biológicas de montaje, por ejemplo que se montan por unión covalente, moléculas naturales, ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN, polisacáridos, tales como dextrano, celulosa, almidón y proteínas, tales como actina, fibrinógeno y fibrina.

De acuerdo con la invención, la expresión objetos de tamaño microscópico se entiende que se refiere a cualquier

sustancia y/o objeto conocido por un experto en la técnica, cuyo tamaño es de 1 a 1000  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 1 a 100  $\mu\text{m}$ .

De acuerdo con la invención, la expresión objetos de tamaño nanoscópico se entiende que se refiere a cualquier  
5 partícula conocida por un experto en la técnica, cuyo tamaño es menor de 1  $\mu\text{m}$  y/o 1000 nm, por ejemplo de 50 nm a 950 nm, de 1 a 100 nm.

De acuerdo con la invención, la película puede formarse, por ejemplo, mediante la polimerización de monómeros a  
10 través de enlaces covalentes, por multimerización de proteínas a través de enlaces covalentes, por ejemplo puentes disulfuro, enlaces peptídicos, a través de enlaces no covalentes, por ejemplo puentes salinos, enlaces hidrógeno, fuerzas de van der Waals, por sedimentación de microorganismos, por multiplicación de microorganismos sobre una superficie, por la secreción de polímeros por estos microorganismos, por ejemplo ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos, por la polimerización de proteínas, por ejemplo de proteínas plasmáticas o proteínas celulares.

15 La película también puede formar mediante la polimerización de monómeros, por ejemplo de acrilamida, bisacrilamida, etileno, propileno, vinilo y aminoácidos; por la deposición de una emulsión sobre una superficie, por ejemplo una pintura o un barniz, por la formación de hidrogeles o aerogeles, por ejemplo, un gel de agarosa, gel agar o gel de gelatina, por ejemplo, un aerogel de sílice, alúmina, óxido de cromo (III) u óxido de estaño o de SEAgel<sup>TM</sup>.

20 De acuerdo con la invención, la película también puede formarse por evaporación/lioofilización de soluciones, por ejemplo, una solución de proteínas, de ADN, de grasa diluida en un disolvente, por ejemplo de emulsiones, por ejemplo una pintura, un barniz, por cambio de fase líquida-sólida inducido, por ejemplo por un cambio de temperatura, por ejemplo con mantequilla fundida, una crema hidratante o una grasa.

25 De acuerdo con la invención, la acción aplicada puede ser, por ejemplo, una acción mecánica, hidrodinámica o física.

30 De acuerdo con la invención, la aplicación puede realizarse, por ejemplo, de 1 a 24 horas, de 1 a 60 minutos, de 1 a 5 minutos o de 1 a 60 segundos.

De acuerdo con la invención, la expresión acciones mecánicas, por ejemplo, se entiende por la aplicación de una brocha, una espátula o un disco sometido a un movimiento alternativo a lo largo de una superficie, a un movimiento rotatorio o circular o a una presión.

35 De acuerdo con la invención, la expresión acciones hidrodinámicas, por ejemplo, se entiende por la rotación, por ejemplo usando un agitador, por ejemplo a una velocidad de rotación de 0,1 a 1000 rpm, de 5 a 300 rpm, y/o la aplicación de un chorro de líquido gas, por ejemplo con una bomba, y un chorro de líquido o gas puede ser, por ejemplo, a una presión de 1,01 a 10 bar, preferiblemente de 1,1 a 2 bar.

40 De acuerdo con la invención, la expresión acciones físicas, por ejemplo, se entiende por una irradiación, por ejemplo mediante radiación electromagnética, por ejemplo, la aplicación de un haz láser que tiene una longitud de onda de 10 nm a 10  $\mu\text{m}$ , de 100 nm a 1  $\mu\text{m}$ . El haz puede tener una intensidad, por ejemplo, de 0,01 W a 100 W, de 0,1 W a 10 W. También puede ser, por ejemplo, un bombardeo de partículas, por ejemplo con partículas nucleares, por  
45 ejemplo neutrones, electrones, partículas aceleradas procedentes de un acelerador de partículas, o de una fuente radioactiva, por ejemplo granos de material, por ejemplo de arena, por ejemplo que tiene un diámetro de 50 a 500  $\mu\text{m}$ , de sal, por ejemplo que tiene un diámetro de 50 a 500  $\mu\text{m}$ , de metal, por ejemplo de cobre, hierro, cinc o aluminio, por ejemplo que tiene un diámetro de 10 a 500  $\mu\text{m}$ .

50 Preferiblemente, dicha al menos una acción aplicada en el procedimiento de la invención es una acción hidrodinámica.

De acuerdo con la invención, el procedimiento puede comprender, independientemente, la aplicación de al menos  
55 dos, o al menos tres acciones que se han descrito previamente. Por ejemplo, el procedimiento de la invención puede comprender la aplicación de una acción hidrodinámica y de una acción electromagnética, por ejemplo una irradiación que usa rayos ultravioleta seguidos, por ejemplo, de una rotación, o una irradiación con partículas beta seguido, por ejemplo, de la aplicación de un chorro de agua.

La solución que puede usarse en la presente invención puede ser, por ejemplo, una solución líquida o un gas. La

- solución puede ser cualquier solución conocida para un experto en la técnica. Por ejemplo, puede ser un medio de cultivo de células eucarióticas y/o procaríotas, un medio de tampón, por ejemplo cualquier medio de tampón conocido para un experto en la técnica, por ejemplo un medio de tampón disponible en el mercado, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS), una muestra biológica, por ejemplo una muestra de sangre, de plasma, de orina o de líquido cefalorraquídeo, una solución salina, por ejemplo una solución fisiológica, un medio de cultivo, por ejemplo la infusión cerebro-corazón disponible en el mercado, un disolvente, por ejemplo acetona, dimetilsulfóxido, etanol, metanol, propanol, acetonitrilo, acetato de etilo, éter, fenol, cloroformo, tetrahidrofurano o difluoroetileno, y/o un hidrocarburo, por ejemplo hexano, ciclohexano, benceno, octano, decano, petróleo, gasolina y diesel.
- 5 De acuerdo con la invención, el gas puede ser, por ejemplo, aire, oxígeno, nitrógeno, neón, argón, dióxido de carbono, metanol u ozono.
- 10 De acuerdo con la invención, una solución líquida puede tener una densidad de 0,1 a 4 kg/l, de 0,3 a 3 kg/l; una solución gaseosa puede tener una densidad de  $10^{-15}$  kg/m<sup>3</sup> a 1000 kg/m<sup>3</sup>, de  $10^{-10}$  a 30 kg/m<sup>3</sup>, de  $10^{-5}$  a 3 kg/m<sup>3</sup>.
- 15 Los expertos en la técnica, debido a su conocimiento general, sabrán fácilmente cómo determinar la densidad de una solución. Por ejemplo, la medición de la densidad de la solución puede realizarse, por ejemplo, midiendo la relación de la masa con respecto al volumen, por ejemplo pesando una solución de un volumen conocido.
- 20 De acuerdo con la invención, la solución puede pretratarse, por ejemplo, la solución puede purificarse, diluirse o concentrarse.
- 25 De acuerdo con la invención, la solución puede purificarse mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica, por ejemplo por diálisis, filtración, ultrafiltración, clarificación y centrifugación. Por ejemplo, el procedimiento de filtración puede comprender pasar la solución a través de un tamiz con poros de 0,2 a 100 µm, el procedimiento de ultrafiltración puede comprender, por ejemplo, una centrifugación a una velocidad de 1 a 3000 revoluciones por minuto durante un tiempo de 0,1 a 30 minutos, el procedimiento de diálisis puede ser, por ejemplo, un procedimiento que comprende una etapa de deposición de la solución sobre una membrana de diálisis, por ejemplo, que tiene un umbral de corte de 500 Da, flotando dicha membrana sobre agua destilada contenida en un recipiente. El procedimiento de clarificación puede ser, por ejemplo, un procedimiento que comprende la adición a la solución del 0,1% (peso/peso) de albúmina sérica bovina.
- 30 De acuerdo con la invención, la purificación de la solución puede posibilitar ventajosamente eliminar de la solución cualquier contaminante y/o moléculas capaces de afectar a la determinación del efecto, por ejemplo la purificación puede hacer posible eliminar, independientemente, bacterias, virus, proteínas, moléculas químicas, sales, granos de material y agregados de moléculas. Por supuesto, los expertos en la técnica, debido a su conocimiento general, sabrán cómo adaptar el procedimiento de purificación en función de la solución.
- 35 De acuerdo con la invención, la solución también puede diluirse, por ejemplo, mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica, por ejemplo por dilución sérica. La dilución puede realizarse con cualquier diluyente conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, puede ser una solución de tampón, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato, una solución salina, por ejemplo suero fisiológico, etanol, DMSO, acetona, hexano y/o cualquier disolvente, hidrocarburo o solución que se ha descrito previamente.
- 40 La solución puede diluirse, por ejemplo, en un factor de 2 a 20 000, de 5 a 500 o de 5 a 50.
- 45 La dilución de la solución puede hacer posible ventajosamente modificar la concentración de los componentes presentes en la solución, por ejemplo reducir la concentración de los mismos, por ejemplo la dilución puede hacer posible reducir la concentración de proteínas. Por lo tanto, la dilución puede hacer posible reducir la concentración de compuestos interferentes y así mejorar ventajosamente la especificidad y/o sensibilidad del procedimiento de la invención.
- 50 De acuerdo con la invención, la solución también puede concentrarse, por ejemplo mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica, por ejemplo por ultracentrifugación, por ultrafiltración, por evaporación o por liofilización.
- 55 De acuerdo con la invención, la purificación, dilución y/o concentración de dicha solución puede permitir ventajosamente ajustar la densidad de dicha solución.

El ajuste de la densidad de la solución hace posible ventajosamente mejorar la sensibilidad del procedimiento de la invención, en particular aumentando, disminuyendo o anulando el efecto de la fuerza de la gravedad que empuja las partículas hacia la superficie.

5

De acuerdo con la invención, el volumen de la solución usado en el procedimiento puede ser, por ejemplo, de 0,3 µl a 100 ml, de 3 µl a 10 ml, de 30 µl a 1 ml.

De acuerdo con la invención, la incubación de la solución puede realizarse, por ejemplo, a una temperatura de -10 °C a 90 °C, de 0 °C a 40 °C o de 15 °C a 25 °C.

10

De acuerdo con la invención, el tiempo de incubación puede realizarse, por ejemplo, de 1 a 72 horas, de 2 a 48 horas, de 1 a 24 horas o de 1 a 60 minutos.

15 De acuerdo con la invención, el término efecto se entenderá, por ejemplo, que se refiere a la abrasión, desgaste, por ejemplo desgaste completo o parcial, desestructuración, destrucción, arrastre, desprendimiento, perforación, aparición de fisuras, grietas, orificios o poros, hinchamiento, contracción y/o inhibición de la formación de la película.

De acuerdo con la invención, el procedimiento de la invención puede realizarse con una pluralidad de partículas, por ejemplo con al menos 2 partículas, con por ejemplo de 2 a 10 000 000, de 1000 a 1 000 000, de 10 000 a 1 000 000, de 100 000 a 1 000 000 o de 10 000 a 100 000. La pluralidad de partículas hace posible ventajosamente detectar directamente, sin un dispositivo complejo de visualización y sin colorante, la interacción entre dichas sustancias a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior que usan una única partícula y requieren, para la detección de la interacción, dispositivos complejos de visualización o colorantes.

20

De acuerdo con la invención, dichas al menos dos partículas pueden seleccionarse entre el grupo que comprende partículas cargadas eléctricamente, partículas magnéticas, partículas revestidas con al menos una capa magnética, partículas magnetizables, partículas recubiertas con una capa magnetizable, partículas eléctricas, electromagnéticas o electrificables, que tienen una carga eléctrica o una mezcla de dos o más de estas partículas. De hecho, puede ser cualquier partícula que permita implementar la presente invención.

25

Ventajosamente, dichas partículas pueden ser una partícula de cualquier forma adecuada para la implementación de la presente invención, por ejemplo en forma de una perla o disco, de forma geométrica asimétrica, por ejemplo con una cara plana, etc.

30

Puede usarse cualquier tamaño apropiado de partícula magnética. El tamaño puede seleccionarse, por ejemplo, en función del tamaño del recipiente de la solución. Por ejemplo, el tamaño de las partículas puede ser menor de una décima parte del tamaño del recipiente, preferiblemente menos de una centésima parte, más preferiblemente aún menos de una milésima parte del tamaño del recipiente. Por ejemplo, la partícula puede tener un tamaño de, por ejemplo, 10 nm a 100 µm, de 0,1 a 10 µm.

35

De acuerdo con la invención, las partículas pueden iluminarse, por ejemplo por medio de una fuente de luz. La iluminación permite ventajosamente aumentar el contraste entre la partícula y la solución.

45 La invención permite ventajosamente, usando una pluralidad de partículas, detectar pequeños deterioros causados por la acción aplicada a la película. El uso de una única partícula y/o perla magnética o magnetizable no permite detectar estos deterioros. Además, existe un riesgo no insignificante de detectar fenómenos inespecíficos, por ejemplo una formación parcial de la película.

50 De acuerdo con la invención, la observación puede realizarse mediante cualquier medio conocido por un experto en la técnica. Este puede ser, por ejemplo, un dispositivo óptico, por ejemplo un microscopio, una cámara, un escáner de documentos, por ejemplo un escáner Epson Perfection V750, o una observación visual.

De acuerdo con la invención, la observación puede permitir medir, por ejemplo, la intensidad, el contraste, o la varianza de una imagen, por ejemplo a través de cualquier medio conocido por un experto en la técnica, por ejemplo software de procesamiento de imágenes, por ejemplo el software ImageJ que permite, por ejemplo, medir, por ejemplo diferencias de contrastes e intensidades, correspondientes, por ejemplo, a las partículas, en zonas de una imagen a otra y así determinar las diferencias de una observación a otra. Puede ser una cuestión, por ejemplo, de comparar las imágenes obtenidas antes y después de la aplicación de la acción mecánica, hidrodinámica o física,

55

por ejemplo realizando una sustracción entre imágenes, por ejemplo midiendo el coeficiente de correlación entre las imágenes.

De acuerdo con la invención, el uso de partículas que emiten una señal, por ejemplo, partículas coloreadas, fluorescentes, fosforescentes, luminiscentes o radiactivas, puede permitir, por ejemplo, una observación automatizada.

De acuerdo con la invención, el efecto puede determinarse visualizando la distribución de las partículas. Por ejemplo, una zona sin partículas puede ser, por ejemplo, un desgarrado en la película, la no dispersión de las películas permite determinar la resistencia de la película a la acción.

De acuerdo con la invención, el reagrupamiento puede realizarse con cualquier medio conocido para un experto en la técnica. Esto puede ser, por ejemplo, cuando las partículas son, por ejemplo, magnéticas o magnetizables, un imán o un campo eléctrico o electromagnético que permite, por ejemplo reagrupar dichas partículas en un punto.

De acuerdo con la invención, el término punto, por ejemplo, se entiende por el reagrupamiento en una ubicación de la pluralidad de partículas formando así sobre la superficie sumergida un punto, un disco, un anillo, una barra, una forma geométrica uniforme, por ejemplo, un cuadrado, un rombo o un triángulo, o una mancha.

De acuerdo con la invención, el término mancha, por ejemplo, se entiende por una zona oscura formada por la pluralidad de partículas en la superficie sumergida.

De acuerdo con la invención, la observación en la etapa (e) puede realizarse sobre una superficie  $S_1$  que puede representar la superficie de observación, por ejemplo en una primera imagen, por ejemplo en una superficie de 1 a 10 000, de 10 a 900, de 50 a 700 o de 100 a 500 píxeles.

De acuerdo con la presente invención, el tamaño de un píxel se define por su anchura x altura, por ejemplo la altura de 0,018 a 0,660 mm, la anchura de 0,018 a 0,660 mm.

De acuerdo con la invención, la observación en la etapa (g) puede realizarse en una superficie  $S_2$  que puede representar la superficie de observación, por ejemplo, en una segunda imagen, por ejemplo una superficie igual a  $S_1$ , una superficie de 1,1 a 2,5 veces la de  $S_1$ , o de 0,5 a 0,9 veces la de  $S_1$ .

Ventajosamente, la comparación que se ha mencionado anteriormente puede permitir medir el grado del efecto de la acción, por ejemplo puede permitir medir el porcentaje y la cantidad de la película modificada por la acción.

De acuerdo con la invención, la comparación de las observaciones puede permitir ventajosamente determinar el porcentaje de dispersión de las partículas en la superficie sumergida y, por lo tanto, un valor del efecto de la acción sobre la película.

Además, el procedimiento de la invención permite obtener un resultado fiable, con una mejor sensibilidad que los procedimientos de la técnica anterior.

Además, el procedimiento de la invención permite determinar, sin un reactivo químico o biológico, el impacto de la acción sobre la película y, además, cuantificar este impacto de manera reproducible y fiable en poco tiempo y no depende de un operador y/o dispositivo particular.

De acuerdo con la invención, el campo puede aplicarse desde el inicio y/o a la mitad de la formación de la película.

De acuerdo con la invención, el campo magnético o eléctrico o electromagnético puede ser cualquier campo que permita desplazar dichas al menos dos partículas sobre dicha superficie sumergida en dicha solución, por ejemplo un campo electromagnético o un campo magnético. El campo magnético o eléctrico o electromagnético puede generarse, por ejemplo, por un imán o por un solenoide. Por ejemplo, el imán puede tener la forma de una barra, punta o pieza, etc. o cualquier forma adecuada para la implementación de la presente invención. El campo puede aplicarse, por ejemplo, por medios conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, por impulso, mediante un aumento gradual del campo electromagnético, por variaciones del campo electromagnético o por una combinación de estas aplicaciones.

De acuerdo con la invención, las partículas pueden depositarse sobre la superficie en forma de una gota que



contiene una sustancia de unión que es soluble en la solución o que puede descomponerse durante la aplicación de una acción.

De acuerdo con la invención, el procedimiento también permite ventajosamente cuantificar el aspecto de las 5 manchas y/o puntos observados después de la aplicación de la acción.

El procedimiento de la invención puede comprender, después de la etapa (f), una etapa (i) de cuantificación (Q) del aspecto las manchas y/o puntos midiendo la desviación estándar media  $D_1$ . La determinación de la desviación estándar media puede realizarse por cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica. La medición 10 puede realizarse por ejemplo, con el software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, <http://rsb.info.nih.gov/ij>), por ejemplo, midiendo en una imagen observada en la etapa (g) contenida, por ejemplo, en una elipse centrada sobre el punto y/o la mancha obtenida en la etapa (c), por el cálculo, mediante el valor aproximado de la varianza de la forma del punto o de la mancha observada en la etapa (g) igual a:

$$15 \quad Q = (D \cdot D - D_0 \cdot D_0) / (I \cdot I),$$

donde I es la medición del contraste, de la intensidad de las manchas como se ha definido previamente y  $D_0$  es la desviación estándar media medida con el software ImageJ del fondo del pocillo alrededor de la mancha, por ejemplo en una elipse situada en contacto con la mancha pero sin incluir la propia mancha.

20 Ventajosamente, la presente invención permite determinar la formación y la destrucción de biopelículas de microorganismos, de películas formadas, por ejemplo, por pinturas, por sustancias alimenticias, por muestras de medios naturales o industriales, por muestras biológicas, por ejemplo biopelículas de microorganismos que pueden ser películas que consisten en una o más especies de microorganismos (bacterias, hongos, algas o protozoos), que 25 se adhieren juntas y a una superficie, y que secretan poco, nada o una cantidad variable de un adhesivo y una matriz protectora que consiste generalmente en polisacáridos.

Además, el procedimiento de la invención permite obtener un resultado fiable con una mejor sensibilidad y una mejor especificidad que los procedimientos de la técnica anterior.

30 Además, el procedimiento de la invención permite obtener un resultado reproducible y, por lo tanto, permite una comparación eficaz y útil de las mediciones realizadas con el procedimiento de la invención.

Otras ventajas serán de nuevo evidentes para un experto en la técnica tras la lectura de los ejemplos a continuación, 35 ilustrados por las figuras adjuntas, dadas a modo de ilustración.

### Breve descripción de las figuras

- La figura 1A representa una fotografía de 6 tiras indicadas de 1 a 6 respectivamente que comprenden en los pocillos de la columnas A y E, agua y microperlas paramagnéticas, de las columnas B y F, BHI a 37 g/l y microperlas paramagnéticas, de las columnas C y G, peptona a 5 g/l y microperlas paramagnéticas, de las columnas D y H, triptona a 5 g/l y microperlas paramagnéticas. Las líneas corresponden a la observación de los pocillos después de una incubación de 2 h 30 min a 37 °C, respectivamente las líneas 1 y 2 antes de la agitación, las líneas 3 y 4 después de 20 segundos de agitación, las líneas 5 y 6 después de 60 segundos de agitación y las líneas 7 y 8 después de 240 segundos de agitación.
- La figura 1B representa un diagrama de la variación de la intensidad atribuible (I<sub>att</sub>) de las manchas (en el eje de abscisas) en función del tiempo de la acción hidrodinámica (T) en segundos (eje de ordenadas). Los cuadrados de color negro representan los valores obtenidos para los pocillos que comprenden el medio de infusión cerebro-corazón (BHI), los triángulos de color negro representan los valores obtenidos para los pocillos que comprenden peptona, los círculos de color negro representan los valores obtenidos para los pocillos que comprenden triptona y los rombos de color negro representan los valores obtenidos para los pocillos que comprenden agua.
- Las figura 2A y 2B son fotografías de pocillos de tiras.
- La figura 2A representa la fotografía de 4 tiras indicadas sw 1 a sw 4 respectivamente que comprenden las siguientes bacterias: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ , *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus* y partículas magnéticas antes de la acción hidrodinámica.
- La figura 2B representa la fotografía de 4 tiras indicadas sw 1 a sw 4 respectivamente que comprenden las siguientes bacterias: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ , *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus* y partículas magnéticas después de la acción hidrodinámica.

- 5 - La figura 3A es un gráfico de barras que representa los resultados de la intensidad (I) (eje de ordenadas) en función de la bacteria (eje de abscisas), BHI representa los pocillos sin bacterias, Lm: *Listeria monocytogenes*, Ec: *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ , Sx: *Staphylococcus xylosum*, Se: *Staphylococcus carnosus*. Barras de color negro: valores antes de la agitación, barras de color blanco: valores después de la agitación.
- 10 - La figura 3B es un gráfico de barras que representa una estandarización de los valores obtenidos en 3A, correspondientes a la proporción de biopelícula no descompuesta (PBNB) después de la acción hidrodinámica (eje de ordenadas) en función de la bacteria (eje de abscisas). BHI representa los pocillos sin bacterias, Lm: *Listeria monocytogenes*, Ec: *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ , Sx: *Staphylococcus xylosum*, Se: *Staphylococcus carnosus*.
- 15 - La figura 3C es un gráfico de barras que representa la cuantificación Q (eje de ordenadas) en función de la bacteria. BHI representa los pocillos sin bacterias, Lm: *Listeria monocytogenes*, Ec: *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ , Sx: *Staphylococcus xylosum*, Se: *Staphylococcus carnosus*.
- 20 - La figura 4A representa una fotografía de 6 tiras indicadas sw 0, sw 2, sw 4, sw 6, sw 8 y sw 24 (respectivamente después de 0, 2, 4, 6, 8 y 24 horas de cultivo a 37 °C) que comprenden, en el pocillo E el medio BHI y partículas magnéticas, en los pocillos F, G y H las bacterias *Listeria monocytogenes* en el medio BHI con partículas magnéticas antes de la acción hidrodinámica.
- 25 - La figura 4B representa una fotografía de 6 tiras indicadas sw 0, sw 2, sw 4, sw 6, sw 8 y sw 24 (respectivamente después de 0, 2, 4, 6, 8 y 24 horas de cultivo a 37 °C) que comprenden, en el pocillo E el medio BHI y partículas magnéticas, en los pocillos F, G y H las bacterias *Listeria monocytogenes* en el medio BHI con partículas magnéticas después de la acción hidrodinámica.
- 30 - La figura 5A es un gráfico de barras que representa los resultados de la intensidad (I) (eje de ordenadas) en función del tiempo (eje de abscisas) a las 0, 2, 4, 6, 8 o 24 horas. Las barras de color blanco corresponden a los resultados obtenidos con *Listeria monocytogenes* (Lm), las barra de color negro a los resultados sin bacterias (BHI).
- 35 - La figura 5B es un gráfico de barras que representa la proporción de biopelícula no descompuesta (PBNB) después de la acción hidrodinámica (eje de ordenadas) en función del tiempo (eje de abscisas) a las 0, 2, 4, 6, 8 o 24 horas. Las barras de color blanco corresponden a los resultados obtenidos con *Listeria monocytogenes* (Lm), las barras de color negro a los resultados sin bacterias (BHI).
- 40 - La figura 5C es un gráfico de barras que representa la cuantificación Q (eje de ordenadas) en función del tiempo (eje de abscisas) a las 0, 2, 4, 6, 8 o 24 horas. Las barras de color blanco corresponden a los resultados obtenidos con *Listeria monocytogenes* (Lm), las barras de color negro a los resultados sin bacterias (BHI).
- 45 - La figura 6A representa una fotografía de 9 tiras de 8 pocillos indicados de 1 a 9 que comprenden bacterias de *Staphylococcus aureus* CIP 76.25A (inoculadas en el medio de cultivo de los pocillos en las columnas B, C, D, E, F y G) que comprenden en el medio de cultivo respectivamente ampicilina (línea 1), ceftazidima (línea 2), cloranfenicol (línea 3), eritromicina (línea 4), piperacilina (línea 5), tetraciclina (línea 6), gentamicina (línea 7), ciprofloxacina (línea 8) o trimetoprima (línea 9), en función de la concentración: sin antibióticos (columna A = control de esterilidad del medio de cultivo con partículas magnéticas, sin bacterias, y columna G = control del medio de cultivo con bacterias, con partículas magnéticas), 4 veces la concentración de base del antibiótico (columnas F y H), 2 veces la concentración de base del antibiótico (columna G), concentración de base del antibiótico (columna D), 0,5 veces la concentración de base del antibiótico (columna C) o 0,25 veces la concentración de base del antibiótico (columna B) y partículas magnéticas antes de la acción hidrodinámica.
- 50 - La figura 6B representa la configuración de la figura 6A pero después de la acción hidrodinámica.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Medición del efecto de una acción hidrodinámica sobre películas de proteínas

50 En este ejemplo, el método se aplica al estudio de la resistencia de las biopelículas formadas a partir de soluciones que son ricas en proteínas.

55 Se prepararon 2,4 ml de soluciones, respectivamente, de agua, BHI (BD-DIFCO, Francia) en 37 g/l, de peptona (Fluka) en 5 g/l y de Bacto (marca registrada) triptona (BD-DIFCO, Francia) en 5 g/l. Estas soluciones se complementaron con una solución de micropelotas paramagnéticas (Ton006N, Biofilm Control, Francia) en una proporción de 10  $\mu$ l/ml. Después, estas soluciones se depositaron en una proporción de 100  $\mu$ l por pocillo, en los pocillos, respectivamente, A y E, B y F, C y G, D y H, de 2 tiras de pocillos de fondo plano (referencia: MSW002B, BioFilm Control, Francia). Las tiras se situaron en bloques de ensayo magnetizados (BKT-MSW002 BioFilm Control,

Francia), y la totalidad del conjunto se puso en un horno termostático (referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizado a 37 °C durante 2 h 30 min.

Después, las tiras se pusieron sobre un agitador orbital (Variomag Monoshake, H+P Labortechnik, Alemania) ajustado al 30 % +/- 10 % de su velocidad de rotación máxima, con el fin de someterlas a una acción hidrodinámica sucesivamente durante 0 s, 5 s, 5 s, 10 s, 10 s, 10 s, 10 s, 10 s, 20 s, 20 s, 20 s, 30 s, 30 s, 30 s, 30 s, sumando así tiempos de agitación total de 0 s, 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s, 60 s, 80 s, 100 s, 120 s, 150 s, 180 s, 210 s y 240 s.

10 Después de cada acción de agitación, las tiras se pusieron en un escáner de documentos (Perfection V-750 PRO, Epson, Estados Unidos) con el que se realizó una toma de imagen con el software EpsonScan (Epson, Estados Unidos).

Las imágenes reproducidas en la figura 1A para los tiempos de agitación de 0 s, 20 s, 60 s y 240 s se obtuvieron añadiendo los componentes de color rojo, verde y azul de las imágenes de color obtenidas con el escáner usando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) y cortando las imágenes obtenidas con diferentes ajustes del contraste. Son visibles en todos los pocillos puntos claramente definidos.

Los puntos y manchas se cuantificaron realizando dos mediciones, respectivamente I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>, de la intensidad media de la imagen contenida en una elipse centrada sobre el punto o mancha superficial, respectivamente, S<sub>1</sub> = 100 a 500 píxeles y S<sub>2</sub> = 1,1 x S<sub>1</sub> a 2,5 x S<sub>1</sub>, con el software ImageJ.

Se obtiene una medición aproximada de la intensidad (I<sub>att</sub>) atribuible al punto o mancha oscura que se observa en las imágenes realizando el siguiente cálculo:

25

$$I_{att} = S_1 \times (I_2 \times S_1 - I_1 \times S_1) / (S_2 - S_1) - I_1 \times S_1$$

Los valores medios de las intensidades obtenidas de este modo se reproducen en la figura 1B y en la tabla 1 a continuación.

30

Tabla 1: Resultados de medición de la intensidad medida

Duración de la aplicación de la acción hidrodinámica en segundos	Intensidad de las manchas			
	Agua	BHI	Peptona	Triptona
0	15356	19650	18068	21335
5	11538	14306	16421	14074
10	6878	13273	17179	10715
20	6975	9803	17081	8701
30	6361	7180	16995	4907
40	7494	5137	13027	2978
50	5031	4368	13421	2176
60	6772	5012	11587	2627
80	5823	4391	11498	1378
100	3983	2825	11777	1017
120	4287	2771	9509	993
150	6495	3777	8523	2285
180	5942	3304	7575	1799
210	5668	2114	5242	607
240	6338	2644	1993	337

Como se representa en la figura 1B y en la tabla anterior, la intensidad de la imagen varía en función del tiempo de agitación y permite medir, por ejemplo, la resistencia de las películas. Como se demuestra en este ejemplo, el procedimiento de la invención hace posible determinar el efecto de una acción, por ejemplo una acción hidrodinámica, sobre una película. En particular, el procedimiento de la invención hace posible determinar la resistencia de las películas entre sí.

35

**Ejemplo 2: Medición del efecto de una acción hidrodinámica sobre biopelículas de diversas especies**

En este ejemplo, el procedimiento de la invención permite estudiar la resistencia de las biopelículas formadas por diversas especies bacterianas.

5 Los cultivos de 16 horas en medio de infusión cerebro-corazón (BHI, BD-DIFCO (Francia)) de los siguientes 4 microorganismos: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ , *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus* se ajustaron a una densidad óptica, a una longitud de onda de 600 nm,  $DO_{600\text{ nm}} = 0,004$  por dilución con BHI estéril, se complementaron con una solución de microperlas paramagnéticas (Ton005N, BioFilm Control, Francia) a una concentración de 10  $\mu\text{l/ml}$ . La medición de la densidad óptica se realizó con un espectrofotómetro (Biomate, Thermo Scientific, Francia). El cultivo ajustado que comprende las microperlas paramagnéticas se depositó en pocillos de fondo plano (referencia: MSW002B, BioFilm Control, Francia) en una proporción de 200  $\mu\text{l/pocillo}$  en los pocillos de referencia F, G y H de 4 tiras, respectivamente de referencia sw1, sw2, sw3 y sw4. Se depositaron 200  $\mu\text{l}$  de BHI estéril complementado con una solución de microperlas paramagnéticas (Ton005N, BioFilm Control, Francia) en una proporción de 10  $\mu\text{l/ml}$  en los pocillos E de cada una de las tiras.

La distribución de las diversas deposiciones se representa en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

	E	F	G	H
Sw1	BHI estéril	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sw2	BHI estéril	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$
Sw3	BHI estéril	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Staphylococcus xylosum</i>
Sw4	BHI estéril	<i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>

20 Cada tira se puso independientemente sobre un bloque de ensayo magnetizado (BKT-MSW002 BioFilm Control, Francia) situado en cajas rectangulares recubiertas de 18 x 12 x 7 cm que contenían dos vasos de precipitados de 25 ml que contenían 20 ml de agua. Después, el conjunto se puso en un horno termostático (referencia: BC240, Firelabo, Francia) estabilizado a 30  $^{\circ}\text{C}$  para las tiras sw1 y sw2 y se estabilizó a 37  $^{\circ}\text{C}$  para las tiras sw3 y sw4 durante 8 horas.

Después, las tiras se pusieron independientemente en un escáner de documentos (Perfection V-750 PRO, Epson, Estados Unidos) con el que se realizó una toma de imagen con el software Epson Scan (Epson, Estados Unidos). Las imágenes finales reproducidas en la figura 2A se obtuvieron añadiendo los componentes de color rojo, verde y azul de las imágenes de color obtenidas con el escáner usando el software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) y cortando las imágenes obtenidas con diversos ajustes del contraste. Son visibles en todos los pocillos puntos claramente definidos.

Después, las tiras se pusieron sobre un agitador orbital (Variomag Monoshake, H+P Labortechnik, Alemania) ajustado al 60 % +/- 20 % de su velocidad de rotación máxima durante 10 segundos. Esta etapa corresponde a someter la película formada en el cultivo a una acción hidrodinámica.

Se realizó una segunda toma de imagen en las mismas condiciones que la primera imagen. La imagen obtenida de este modo corresponde a la figura 2B. En esta figura, son visibles puntos y manchas que están más o menos claramente definidos, y su aspecto depende de la cepa bacteriana que había formado la biopelícula. Los puntos en la línea E son notablemente menos intensas, lo que corresponde a una dispersión máxima de las microperlas paramagnéticas bajo la acción hidrodinámica.

Los puntos y manchas se cuantificaron realizando dos mediciones, respectivamente  $I_1$  e  $I_2$ , de la intensidad media de la imagen contenida en una elipse centrada sobre el punto o mancha superficial, respectivamente,  $S_1 = 100$  a 500 píxeles y  $S_2 = 1,1 \times S_1$  a  $2,5 \times S_1$ , con el software ImageJ.

Se obtiene una medición aproximada de la intensidad ( $I_{\text{att}}$ ) atribuible al punto o mancha oscura que se observa en las imágenes realizando el siguiente cálculo:

50

$$I_{\text{att}} = S_i \times (I_2 \times S_2 - I_1 \times S_i) / (S_2 - S_i) - I_1 \times S_i$$

Los valores medios de las intensidades obtenidas de este modo se reproducen en la figura 3A y en la tabla 3 a continuación, correspondiendo las barras de error a la desviación estándar de las mediciones hechas.

Tabla 3: Resultados de mediciones de la intensidad medida

I <sub>att</sub>	Antes de la magnetización		Después de la magnetización	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
BHI	5,40E+03	3,45E+02	8,86E+02	2,49E+02
Lm	4,24E+03	4,72E+02	2,69E+03	2,16E+02
Ec	4,24E+03	4,50E+02	3,80E+02	7,41E+01
Sx	3,82E+03	3,03E+02	9,49E+02	8,20E+02
Sc	5,57E+03	2,30E+02	1,04E+03	4,23E+02

5

Las intensidades primarias después de la magnetización se estandarizan dividiéndolas por la intensidad primaria antes de la magnetización y permiten obtener una medida aproximada de la proporción de biopelícula no descompuesta por la acción hidrodinámica (PBNB). Los resultados obtenidos para este ejemplo se reproducen en la figura 3B y en la tabla 4 a continuación, correspondiendo las barras de error a la desviación estándar de las mediciones.

10

Tabla 4

Medio	Media	Desviación estándar
BHI	0,16393578	0,05648906
Lm	0,63556509	0,12167536
Ec	0,08963821	0,0269836
Sx	0,24868618	0,2345908
Sc	0,1874682	0,08374593

El aspecto de los puntos y manchas también puede cuantificarse (valor Q) deduciéndolo de la desviación estándar media D1 medida con el software ImageJ de la imagen contenida en una elipse centrada sobre el punto o mancha por el cálculo del valor aproximado de la varianza de la forma del punto o mancha igual a:

15

$$Q = (D1 \cdot D1 - D0 \cdot D0) / (I \cdot I)$$

donde I es la intensidad calculada como se ha descrito anteriormente y D0 es la desviación estándar media medida con el software ImageJ del fondo del punto alrededor de la mancha.

20

Los resultados obtenidos para este ejemplo se reproducen en la figura 3C y en la tabla 5 a continuación, correspondiendo las barras de error a la desviación estándar de las mediciones.

25

Tabla 5

Varianzas estandarizadas	Antes de la magnetización		Después de la magnetización	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
BHI	1,88E-04	7,63E-05	3,38E-05	8,57E-06
Lm	1,98E-05	9,43E-05	3,54E-05	1,11E-05
Ec	6,33E-04	2,29E-04	3,97E-05	7,11E-06
Sx	2,91E-03	2,61E-03	2,80E-05	9,39E-06
Sc	2,17E-04	2,98E-04	2,84E-05	8,56E-06

Como se demuestra en este ejemplo, el procedimiento de la invención hace posible determinar el efecto de una acción, por ejemplo una acción hidrodinámica, sobre una biopelícula. En particular, el procedimiento de la invención hace posible determinar la resistencia de las películas entre sí.

30

Además, el procedimiento de la invención hace posible detectar, muy sensible y rápidamente, la desviación de las partículas y el efecto de la acción sobre la película.

35

**Ejemplo 3: Medición del efecto de una acción hidrodinámica sobre las biopelículas en formación**

En este ejemplo, los dispositivos y los productos usados son idénticos a los del ejemplo anterior.

- 5 Un cultivo de 16 horas en medio BHI (BD-DIFCO (Francia)) de *Listeria monocytogenes* se ajusta a  $DO_{600\text{ nm}} = 0,004$  por dilución con BHI estéril, complementado con una solución de microperlas paramagnéticas (Ton005N, BioFilm Control, Francia) en una proporción de 10  $\mu\text{l/ml}$ , después se depositaron 200  $\mu\text{l/pocillo}$  en los pocillos de fondo plano (referencia: MSW002B, BioFilm Control, Francia) indicados F, G y H de 6 tiras, respectivamente sw0, sw2, sw4, sw6, sw8 y sw24. Se depositaron 200  $\mu\text{l}$  de BHI estéril complementado con 10  $\mu\text{l/ml}$  de una solución de microperlas paramagnéticas (Ton005N, BioFilm Control, Francia) en los pocillos E de cada una de las tiras.

La distribución de las diversas deposiciones se representa en la tabla 6 que se indica a continuación.

Tabla 6

	E	F	G	G
Sw0	BHI estéril	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sw2	BHI estéril	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sw4	BHI estéril	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sw8	BHI estéril	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sw24	BHI estéril	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

- 15 Las tiras se pusieron en bloques de ensayo magnetizados (BKT-MSW002 BioFilm Control, Francia) situados en cajas rectangulares cubiertas de 18 x 12 x 7 cm que contenían dos vasos de precipitados de 25 ml que contenían 20 ml de agua, estando el conjunto en su totalidad situado en un horno termostático (referencia: BC240, Firelabo, Francia) estabilizado a 30 °C durante, respectivamente, 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h.

- 20 Después, las tiras se pusieron en un escáner de documentos (Perfection V-750 PRO, Epson, Estados Unidos) con el que se realizó una toma de imagen con el software EpsonScan (Epson, Estados Unidos). Las imágenes finales reproducidas en la figura 4A se obtuvieron añadiendo los componentes de color rojo, verde y azul de las imágenes del componente rojo de las imágenes de color obtenidas con el escáner usando el software ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij) y cortando las imágenes obtenidas con diversos ajustes del contraste. La imagen obtenida se representa en la figura 4A. Son visibles en todos los pocillos puntos claramente definidos.

- 25 Después, las tiras se pusieron sobre un agitador orbital (Variomag Monoshake, H+P Labortechnik, Alemania) ajustado al 60 % +/- 20 % de su velocidad de rotación máxima durante 10 segundos con el fin de someterlas a una acción hidrodinámica.

- 30 Se realizó una segunda toma de imagen en las mismas condiciones que la primera imagen y la imagen final se reproduce en la figura 4B. Los puntos y manchas que están más o menos claramente definidos son visibles, y su aspecto depende de la cepa bacteriana que había formado la película.

- 35 Los puntos y manchas se cuantificaron realizando dos mediciones, con el software ImageJ, respectivamente  $I_1$  e  $I_2$ , de la intensidad media de la imagen contenida en una elipse centrada sobre el punto o mancha superficial, respectivamente,

- 40  $S_1 = 100$  a 500 píxeles y  $S_2 = 1,1 \times S_1$  a  $2,5 \times S_1$

Se obtiene una medición aproximada de la intensidad ( $I_{att}$ ) atribuible al punto o mancha oscura que se observa en las imágenes realizando el siguiente cálculo:

- 45  $I_{att} = S_i \times (I_2 \times S_2 - I_1 \times S_i) / (S_2 - S_i) - h \times S_1$

Los valores medios de las intensidades obtenidas de este modo se reproducen en la figura 5A y en la tabla 7 a

continuación, correspondiendo las barras de error a la desviación estándar de las mediciones hechas.

Tabla 7

Tiempo	BHI	Lm	Desviación estándar Lm
0 h	-1,72E+01	-5,82E+00	3,55E+01
2 h	3,74E+02	7,94E+02	9,81E+01
4 h	8,14E+02	6,02E+02	1,95E+02
6 h	6,64E+02	2,54E+03	3,29E+02
8 h	7,52E+02	2,44E+03	1,79E+02
24 h	8,26E+02	2,07E+03	2,19E+01

5 Las intensidades primarias después de la magnetización se estandarizaron dividiéndolas por la intensidad primaria antes de la magnetización y permiten obtener una medición aproximada de la proporción de película no descompuesta (PBNB) por la acción hidrodinámica. Estos resultados se reproducen en la figura 5B y en la tabla 8 que se indica a continuación.

10

Tabla 8

Tiempo	BHI	Lm	Desviación estándar Lm
0 h	-0,00360422	-0,0011256	1,04E-03
2 h	0,06975705	0,13379324	1,05E-01
4 h	0,15521974	0,11969938	1,34E-01
6 h	0,11833857	0,533572	1,52E-01
8 h	0,1325017	0,5516224	2,17E-01
24 h	0,16997323	0,5647522	1,72E-01

El aspecto de los puntos y manchas también puede cuantificarse Q deduciéndolo de la desviación estándar media D1 medida con el software ImageJ de la imagen contenida en una elipse centrada sobre el punto o mancha por el cálculo del valor aproximado de la varianza de la forma del punto o mancha de acuerdo con la siguiente fórmula:

15

$$Q = (D1 \cdot D1 - D0 \cdot D0) / (I \cdot I),$$

donde I es la intensidad calculada como se ha descrito anteriormente y D0 es la desviación estándar media medida con el software ImageJ del fondo del punto alrededor de la mancha o el punto.

20

Los resultados obtenidos para este ejemplo se reproducen en la figura 5C, correspondiendo las barras de error a la desviación estándar de las mediciones.

Tabla 9

Tiempo	BHI	Lm	Desviación estándar Lm
0 h	-4,25E-03	-3,30E-03	0,003635176
2 h	1,06E-03	3,20E-04	0,000216958
4 h	5,36E-03	6,81E-04	0,000686718
6 h	4,35E-04	9,43E-05	1,33109E-05
8 h	4,63E-04	1,08E-04	3,16769E-05
24 h	6,71E-04	1,64E-04	3,72707E-05

25

Como se demuestra en este ejemplo, el procedimiento de la invención hace posible determinar el efecto de una acción, por ejemplo una acción hidrodinámica, sobre una biopelícula. En particular, el procedimiento de la invención hace posible determinar la resistencia de las películas entre sí.

30 Además, el procedimiento de la invención hace posible detectar, muy sensible y rápidamente, la desviación de las partículas y el efecto de la acción sobre la película.

**Ejemplo 4: Medición del efecto de un antibiótico y de una acción hidrodinámica sobre las biopelículas**

35 En este ejemplo, los dispositivos y los productos usados son idénticos a los del ejemplo anterior.

Un cultivo de 16 horas en medio BHI (BD-DIFCO (Francia)) de *Staphylococcus aureus* CIP 76.25A se ajusta a

DO<sub>600 nm</sub> = 0,004 por dilución con BHI estéril, complementado con 10 µl/ml de una solución de microperlas paramagnéticas (Ton005N, BioFilm Control, Francia) y se depositaron 200 µl/pocillo en los pocillos de fondo plano, respectivamente las líneas 1 a 9, y respectivamente las columnas G a B, de una placa (referencia: MMB002B BioFilm Control, Francia). Cada solución se complementó con antibióticos, respectivamente, ampicilina C = 0,5 µg/ml, ceftazidima C = 16 µg/ml, cloranfenicol C = 16 µg/ml, eritromicina C = 0,5 µg/ml, piperacilina C = 1 µg/ml, tetraciclina C = 2 µg/ml, gentamicina C = 16 µg/ml, ciprofloxacina C = 2 µg/ml, trimetoprima C = 64 µg/ml, a diversas concentraciones, respectivamente, 0xC, 4xC, 2xC, C, 0,5xC y 0,25xC.

Se depositaron en los pocillos de la columna H, respectivamente las líneas 1 a 9, 200 µl de BHI complementado con 10 µl/ml de una solución de microperlas paramagnéticas (Ton005N, BioFilm Control, Francia) y con antibiótico a una concentración de 4xC de, respectivamente, ampicilina C = 0,5 µg/ml, ceftazidima C = 16 µg/ml, cloranfenicol C = 16 µg/ml, eritromicina C = 0,5 µg/ml, piperacilina C = 1 µg/ml, tetraciclina C = 2 µg/ml, gentamicina C = 16 µg/ml, ciprofloxacina C = 2 µg/ml, trimetoprima C = 64 µg/ml.

La columna A corresponde a pocillos de control de BHI estéril complementados únicamente con una solución de microperlas paramagnéticas.

La columna G corresponde a controles de viabilidad de *Staphylococcus aureus* CIP 76.25a. La columna H corresponde a pocillos de control de BHI estéril complementados con una solución de microperlas paramagnéticas en presencia de una dosis máxima de antibióticos.

La distribución de las diversas deposiciones se representa en la tabla 10 que se indica a continuación.

Tabla 10

	H	G	F	E	D	C	B	A
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-
1 Ampicilina	4 x C	0 x C	4 x C	2 x C	C	0,5 x C	0,25 x C	0 x C
2 Ceftazidima	4 x C	0 x C	4 x C	2 x C	C	0,5 x C	0,25 x C	0 x C
3 Cloranfenicol	4 x C	0 x C	4 x C	2 x C	C	0,5 x C	0,25 x C	0 x C
4 Eritromicina	4 x C	0 x C	4 x C	2 x C	C	0,5 x C	0,25 x C	0 x C
5 Piperacilina	4 x C	0 x C	4 x C	2 x C	C	0,5 x C	0,25 x C	0 x C
6 Tetraciclina	4 x C	0 x C	4 x C	2 x C	C	0,5 x C	0,25 x C	0 x C
7 Gentamicina	4 x C	0 x C	4 x C	2 x C	C	0,5 x C	0,25 x C	0 x C
8 Ciprofloxacina	4 x C	0 x C	4 x C	2 x C	C	0,5 x C	0,25 x C	0 x C
9 Trimetoprima	4 x C	0 x C	4 x C	2 x C	C	0,5 x C	0,25 x C	0 x C

Las tiras se pusieron en bloques de ensayo magnetizados (BKT-MWS002 BioFilm Control, Francia) situados en cajas rectangulares cubiertas de 18 x 12 x 7 cm que contenían dos vasos de precipitados de 25 ml que contenían 20 ml de agua. El conjunto se puso en un horno termostático (referencia: BC240, Firelabo, Francia) estabilizado a 37 °C durante 16 horas.

Después, las tiras se pusieron en un escáner de documentos (Perfection V-750 PRO, Epson, Estados Unidos) con el que se realizó una toma de imagen con el software EpsonScan (Epson, Estados Unidos).

Las imágenes finales obtenidas se representan en la figura 6A. Se obtuvieron añadiendo los componentes de color rojo, verde y azul de las imágenes del componente rojo de las imágenes de color obtenidas con el escáner usando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) y cortando las imágenes obtenidas con diversos ajustes del contraste.

Como se representa en la figura 6A, los puntos se definen claramente y son visibles en todos los pocillos.

Después, las tiras se pusieron sobre un agitador orbital (Variomag Monoshake, H+P Labortechnik, Alemania) ajustado al 60 % +/- 20 % de su velocidad de rotación máxima durante 10 segundos con el fin de someterlas a una acción hidrodinámica.

Se realizó una segunda toma de imagen en las mismas condiciones que la primera imagen y la imagen final obtenida se representa en la figura 6B.

Como se representa en la figura 6B, son visibles puntos y manchas que están más o menos claramente definidos, y



su aspecto depende del antibiótico y de la concentración del antibiótico usado.

Como se demuestra en este ejemplo, el procedimiento de la invención hace posible determinar el efecto de una acción, por ejemplo una acción hidrodinámica, sobre una biopelícula. En particular, el procedimiento de la invención  
5 hace posible determinar la resistencia de las películas entre sí en presencia o ausencia de agentes.

**Lista de referencias**

- 10
1. Physica Scripta., Vol. 65, 167-180 (2002): "Refractive Index Measurement and its Applications"
  2. Voros y col., Biophysical Journal, Vol. 87, 553-561 (2004): "The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers"

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para medir el efecto de una acción sobre una película que comprende las siguientes etapas:
- 5
- a) introducir, en una solución, al menos una sustancia capaz de formar una película,
  - b) introducir, en la solución obtenida en (a), al menos dos partículas, reposando dichas partículas sobre una superficie sumergida S en dicha solución,
  - 10 c) reagrupar las partículas sobre dicha superficie sumergida S, formando dichas partículas sobre dicha superficie un punto o una mancha,
  - d) formar dicha película de dicha sustancia,
  - e) observar el punto o mancha sobre la superficie S,
  - f) aplicar una acción mecánica y/o física a dicha solución,
  - 15 g) observar el efecto sobre la película de la acción aplicada en la etapa (f) observando el punto o mancha sobre la superficie S, y
  - h) determinar el efecto de la acción aplicado a la película comparando las observaciones de las etapas que se han mencionado anteriormente (e) y (g).
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la acción es una acción seleccionada entre una acción mecánica o física.
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia capaz de formar una biopelícula se selecciona entre microorganismos, alimentos y sustancias químicas.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas, al menos dos, partículas son independientemente una partícula magnética, una magnetizable o una eléctricamente cargada o una partícula cubierta con al menos una capa magnética o magnetizable.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas, al menos dos, partículas se iluminan por medio de una fuente de luz para aumentar el contraste entre la partícula y la solución.
- 30

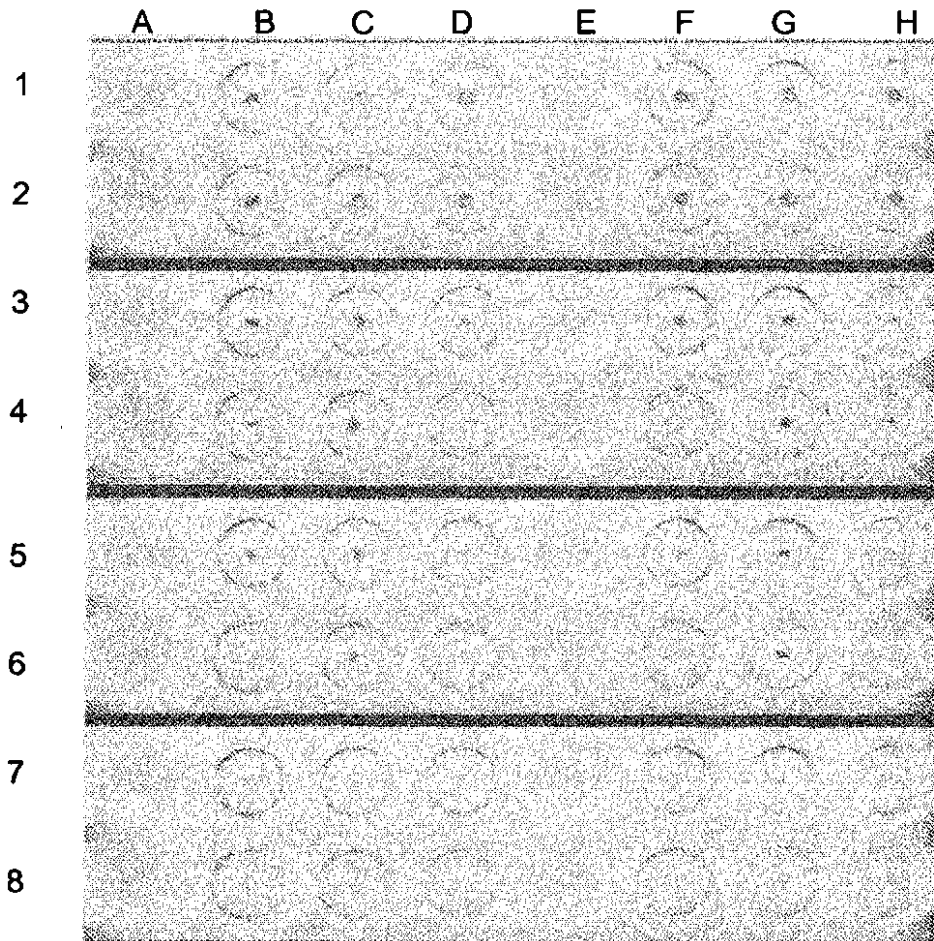


FIGURA 1A

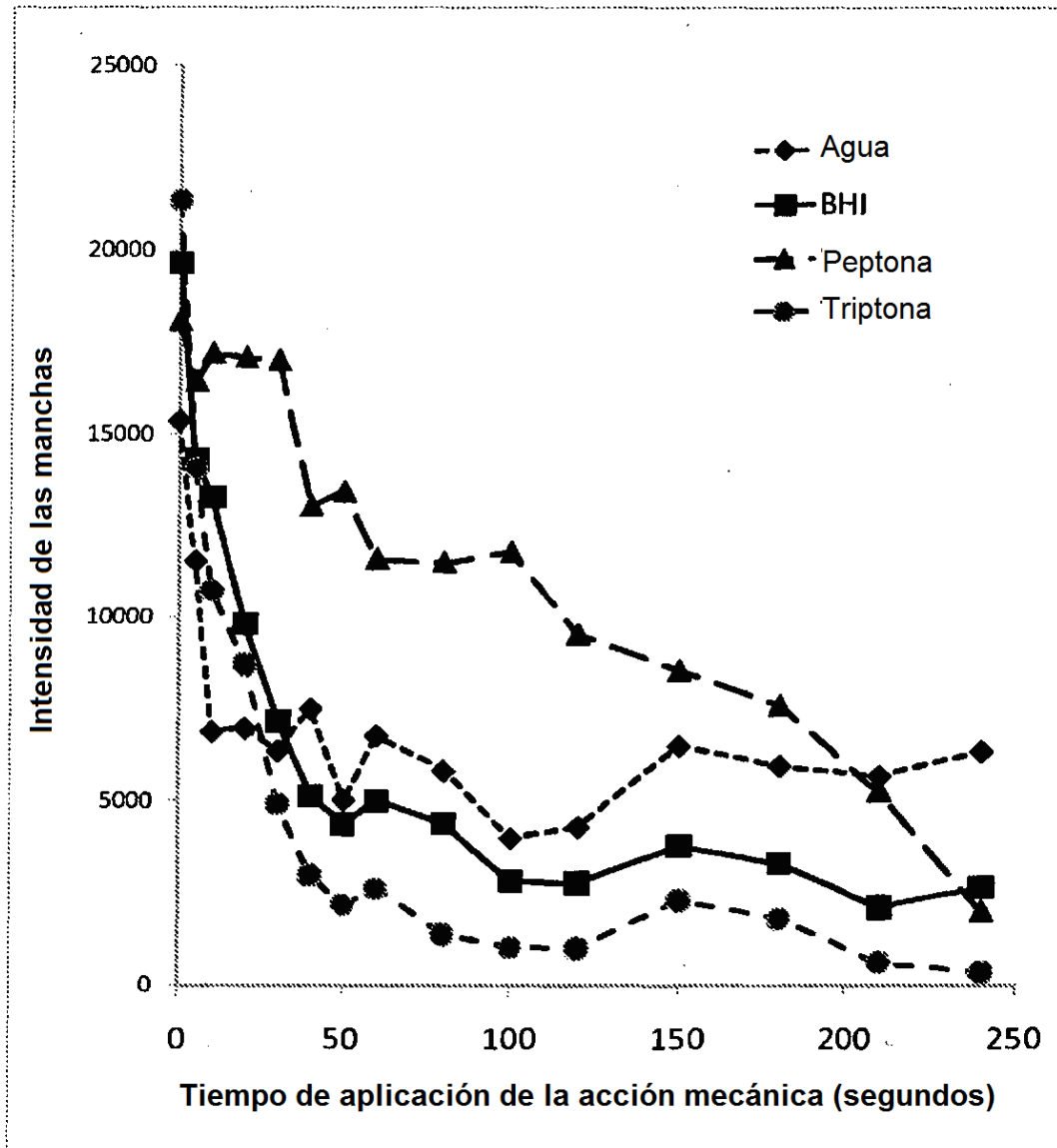


FIGURA 1B

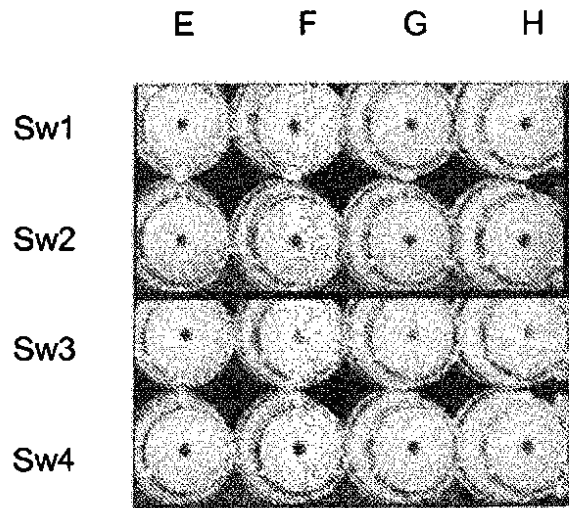


FIGURA 2A

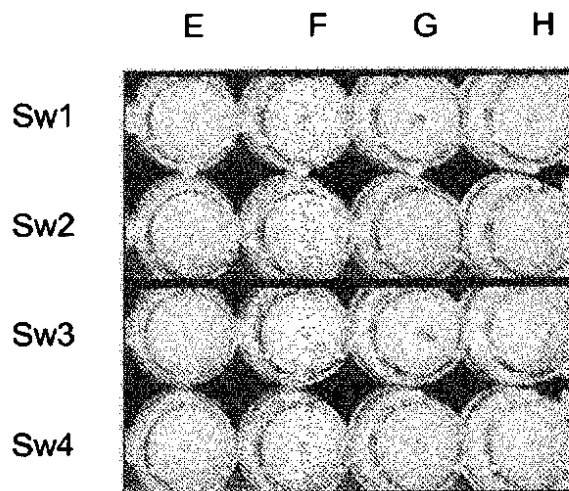


FIGURA 2B

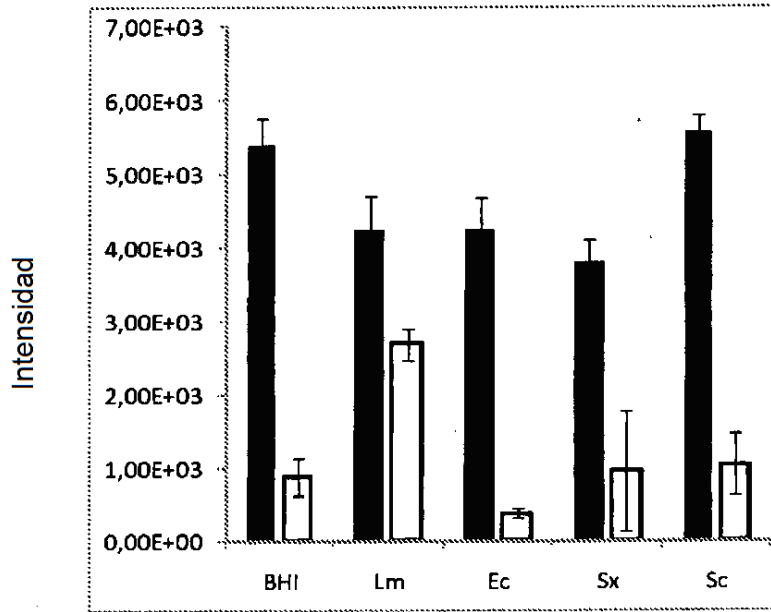


FIGURA 3A

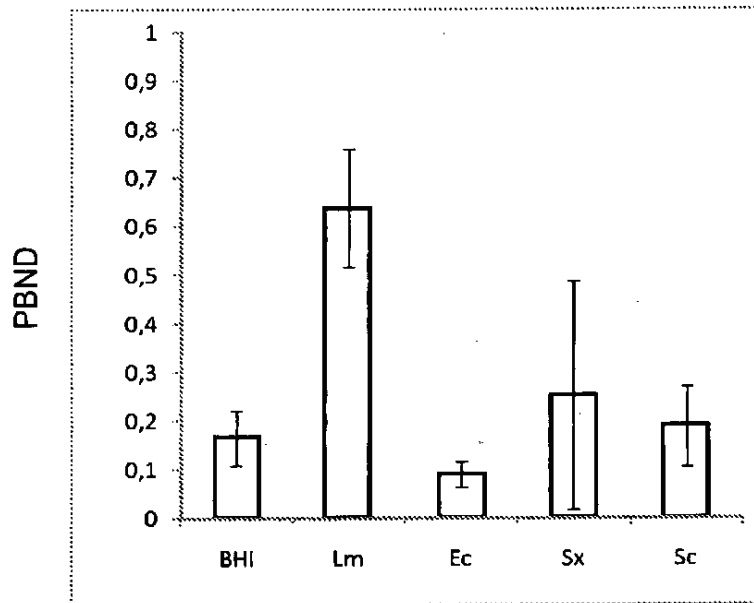


FIGURA 3B

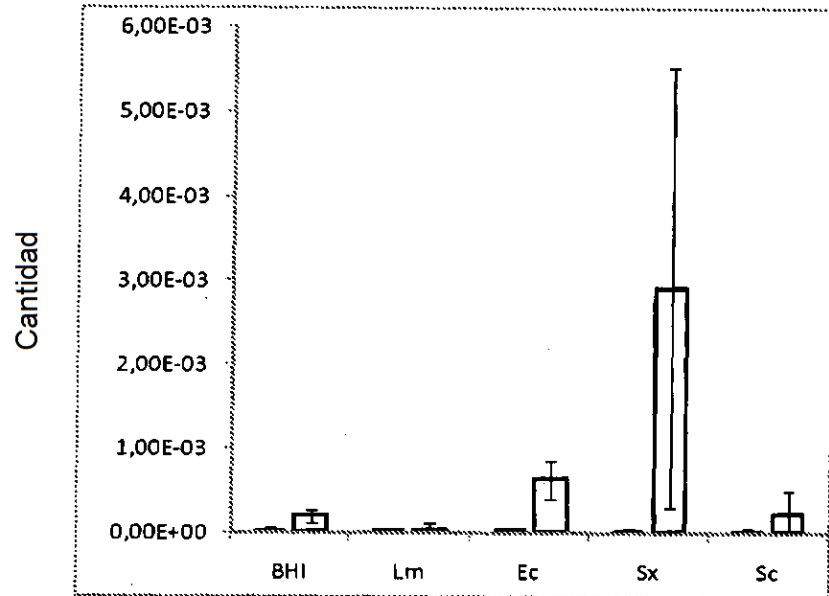


FIGURA 3C

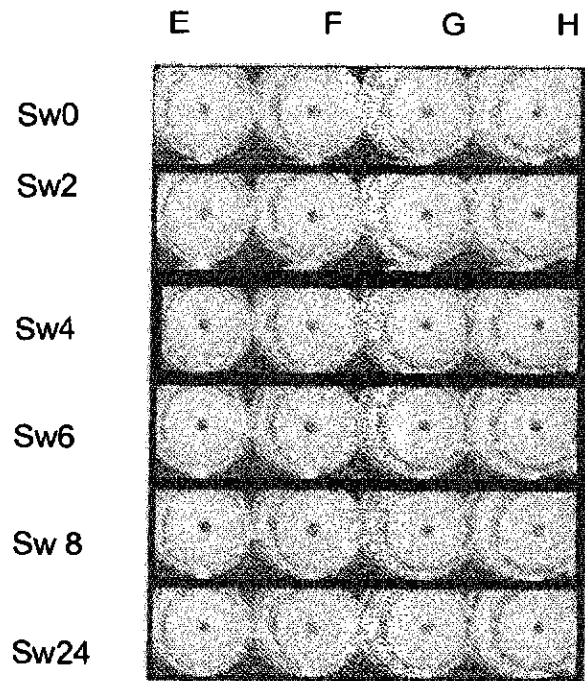


FIGURA 4 A

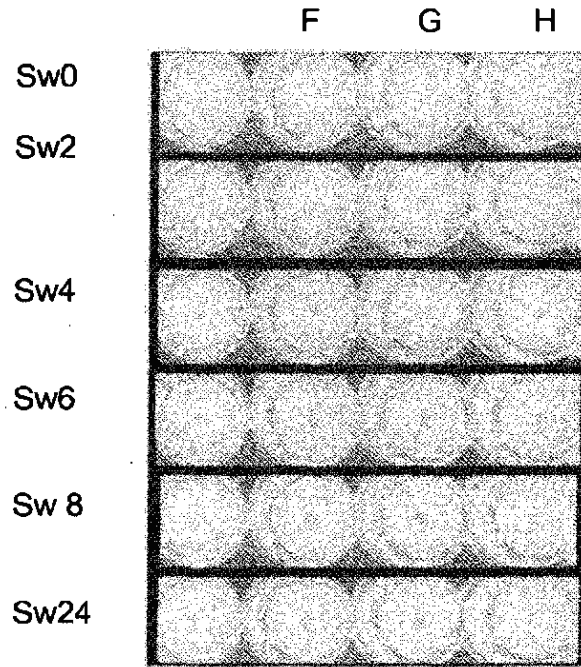


FIGURA 4B

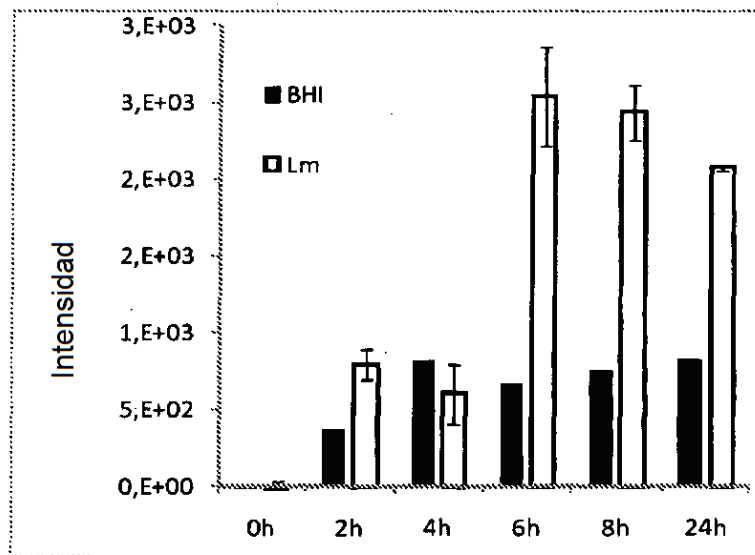


FIGURA 5A



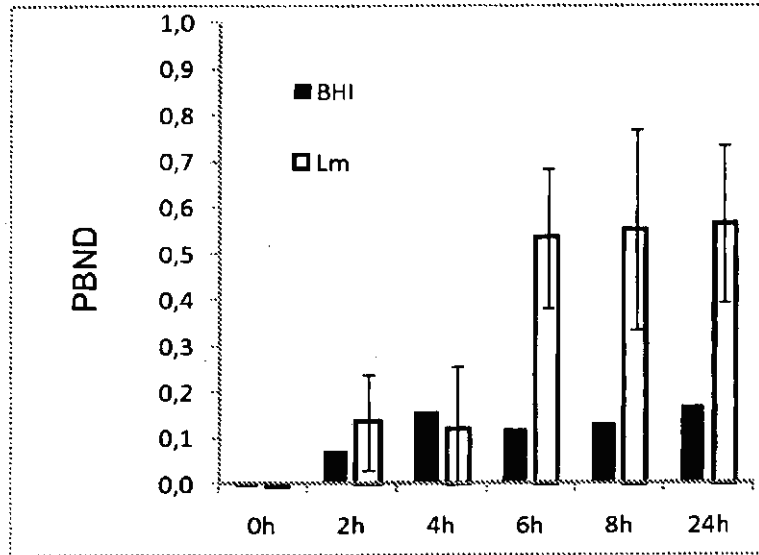


FIGURA 5B

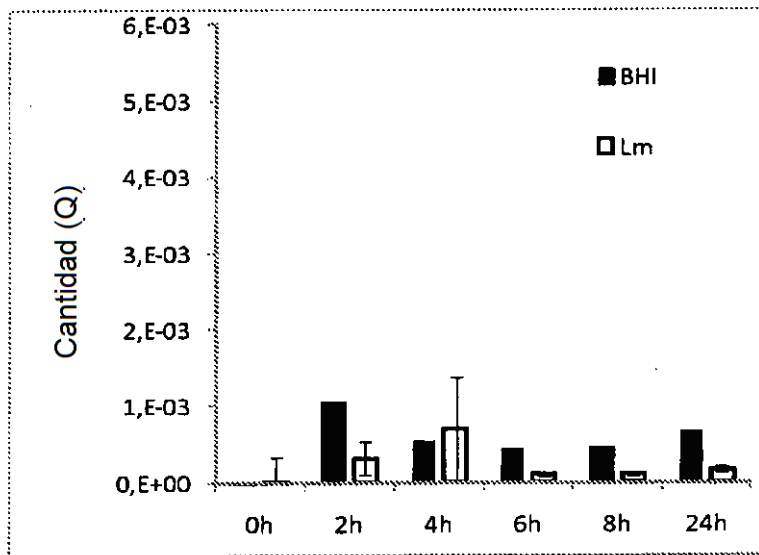


FIGURA 5C

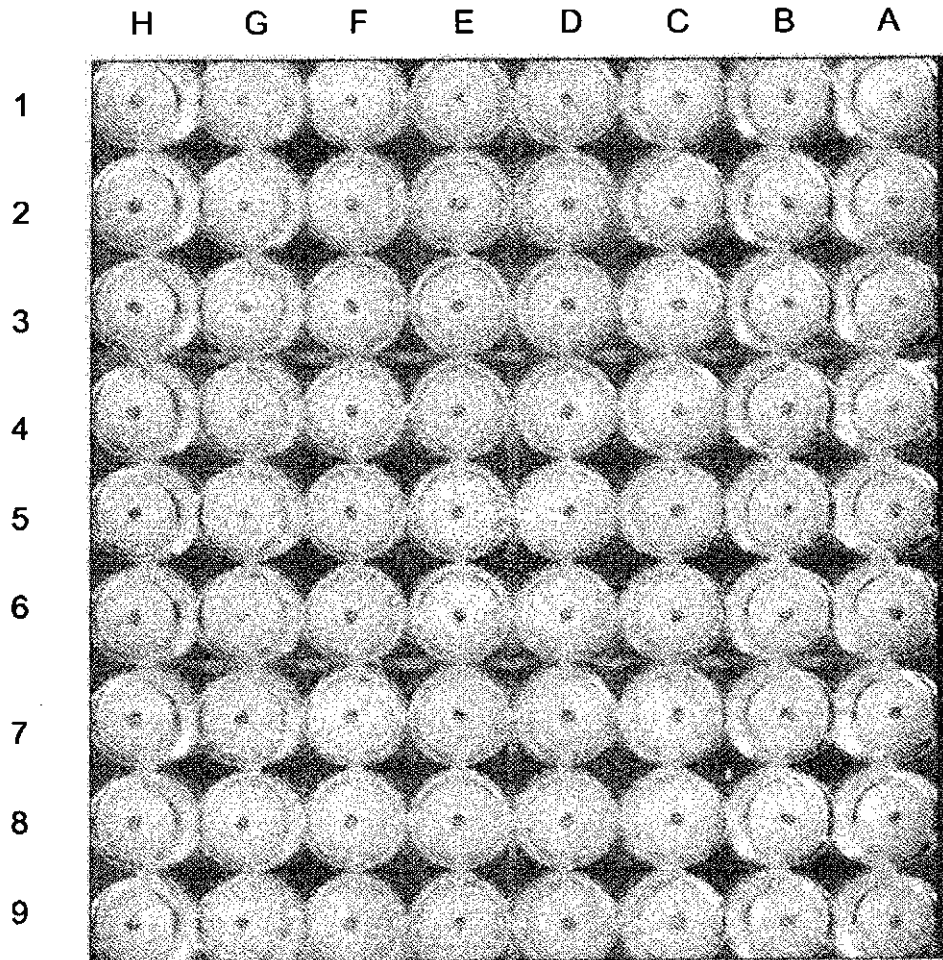


FIGURA 6A

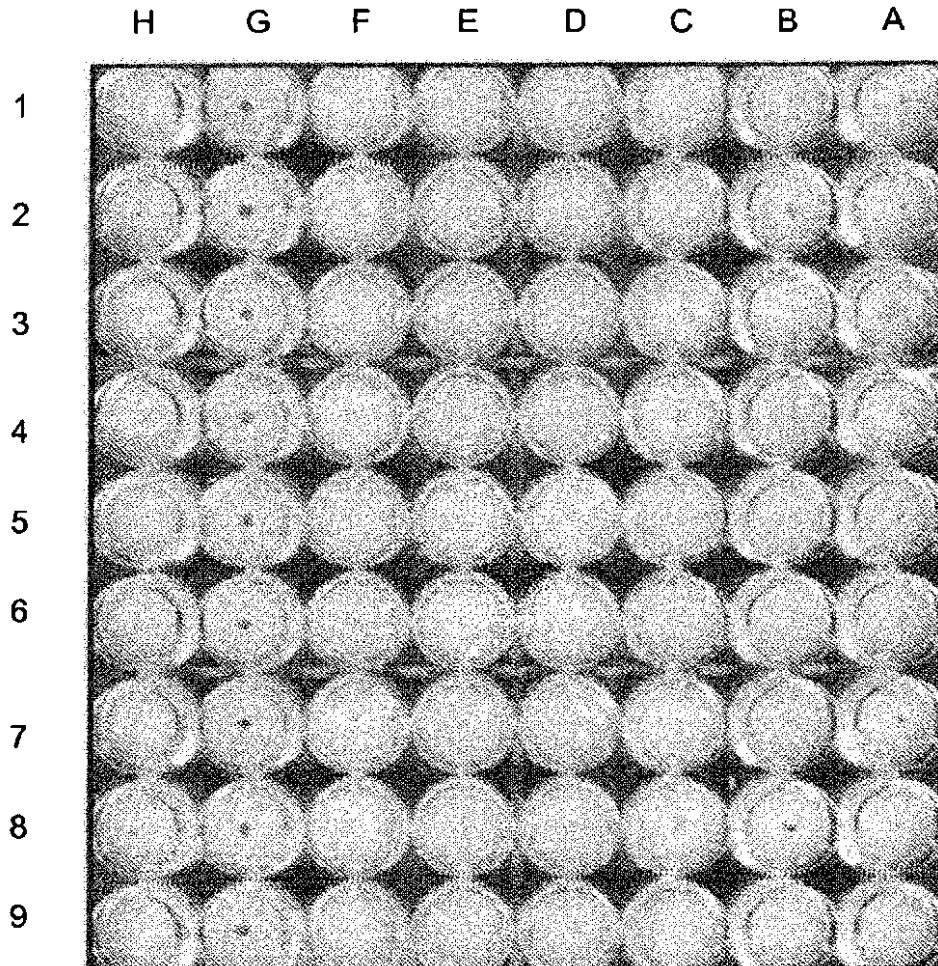


FIGURA 6B