

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 996**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2013 E 13700708 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2804953**

54 Título: **Método para marcar específicamente bacterias vivas**

30 Prioridad:

18.01.2012 EP 12151622

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.01.2016

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR y
UNIVERSITE PARIS-SUD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DUKAN, SAM;
DUMONT, AUDREY;
AWWAD, MONZER;
MALLERON, ANNIE y
VAUZEILLES, BORIS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 556 996 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 marcar específicamente bacterias vivas.

5 La presente invención se refiere a un método para marcar específicamente, y más particularmente para detectar específicamente bacterias vivas en una muestra que comprende bacterias.

10 Los métodos tradicionales para detectar bacterias vivas implican el cultivo de las bacterias y su recuento mediante visualización de las colonias sobre un medio sólido. Dichos métodos no son rápidos, ya que el cultivo puede requerir mucho tiempo. Además, dichos métodos se restringen necesariamente a la detección de bacterias cultivables y no de bacterias vivas. En efecto, la cuantificación de éstas no es fiable porque se ha demostrado que algunas bacterias son eliminadas debido al estrés del cultivo sobre un medio sólido. Al utilizar recuentos de placa los microbiólogos han partido de una importante premisa, que es que este método no presenta efectos perjudiciales sobre las bacterias. Sin embargo, y desde los años 1950, se ha informado de que las células aparentemente muertas podrían reactivarse mediante la adición a las placas de agar de secuestrantes (por ejemplo piruvato, catalasa, superóxido dismutasa, etc.) de especies de oxígeno reactivo, las cuales son producidas naturalmente durante la respiración aerobia [40-48]. Por ejemplo, diversos tóxicos, tales como el ayuno, HOCl, el choque térmico y la desecación, pueden dejar a las células en un estado fisiológico vulnerable en el que el oxígeno atmosférico, durante el periodo de recuperación, incrementa el efecto tóxico del agente estresante primario.

20 Con el fin de superar dichas limitaciones se han propuesto varios métodos indirectos no basados en el cultivo para evaluar la viabilidad bacteriana, la totalidad de los cuales también presentan ventajas y desventajas. Por lo tanto, no se ha acordado ningún método como adecuado para todos los casos. Estos métodos evalúan la viabilidad según un criterio de entre dos posibles: demostración de la actividad metabólica o mantenimiento de las estructuras celulares.

25 Antes de la utilización de la tecnología de fluorescencia, entre los métodos que se han utilizado como indicaciones de la actividad metabólica celular se incluyen la utilización de la microautorradiografía [25], así como la actividad enzimática inducible [26], como indicadores de la síntesis *de novo* de proteínas, el método directo de recuento de células viables (DVC, por sus siglas en inglés) [27], que se basa en el agrandamiento de las células al añadir nutrientes, y en la reducción de las sales de tetrazolio como indicación de una cadena de transporte electrónico activa [28]. Sin embargo, existen desventajas asociadas a la utilización de estos métodos. El DVC y los ensayos de reducción de la sal de tetrazolio requieren la adición de nutrientes [28, 29] y, de esta manera, son dependientes de la capacidad del organismo de responder a los nutrientes aportados. Las mediciones de la respiración también presentan desventajas. Se ha demostrado que un abanico de factores afecta a la formación de depósitos de formazán por la reducción de la sal de tetrazolio [29] y un informe ha demostrado que la sal de tetrazolio llamada cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil-tetrazolio inhibe el metabolismo bacteriano [30].

40 También se han desarrollado ensayos de viabilidad celular basados en la tinción de células con fluorocromos. Estos métodos evalúan la viabilidad a partir del mantenimiento de estructuras celulares estables. Los recuentos directos de naranja acridina [31] y la tinción con 4P,6-diamidino-2-fenilindol [32] se han utilizado como indicación del mantenimiento de ácidos nucleicos intactos. La rodamina 123 ha sido utilizada extensamente como indicador del potencial de membrana, y con el desarrollo de la citometría de flujo, se ha producido un incremento considerable de métodos de caracterización del estado fisiológico de las células [33]. La permeabilidad de estos pigmentos podría ser un problema en algunos organismos. Más recientemente, se han utilizado algunos nuevos ensayos para evaluar la viabilidad bacteriana; estos caracterizan algunos aspectos de la actividad metabólica (como la actividad de la esterasa, monitorizada con la sonda fluorescente ChemChrome V6) [34], de la integridad celular (como la integridad de la membrana: kit BacLight), el potencial de membrana, el pH intracelular [35] y el ATP [36]. Finalmente, se ha desarrollado un nuevo enfoque desde 2002 que implica la detección basada en el ARN mensajero de los patógenos bacterianos viables y la cuantificación mediante PCR en tiempo real de los patógenos [37].

50 El documento US 2008/268468 describe un método para detectar células vivas utilizando un conjugado de monosacáridos que se incorpora en la capa externa de glicanos de las células.

55 Mediante la utilización de métodos que permiten la detección de células viables al nivel de células individuales, los microbiólogos han partido de una importante premisa, al asumir que estas células podrán con el tiempo volver a crecer. Sin embargo, algunos autores han propuesto que esta observación es una consecuencia del deterioro celular y que las células viables, aunque no cultivables, están moribundas [40, 49].

60 En consecuencia, puede esperarse que el número de células aparentemente viables sobreestimaré el número de células verdaderamente vivas (cultivables, es decir capaces de dividirse/multiplicarse durante el tiempo).

Aunque muchos de dichos métodos presentan las limitaciones anteriormente indicadas, resulta evidente además que las bacterias no vivas mantienen determinadas características de las células viables que están incluidas en los métodos, tales como la actividad enzimática. De acuerdo con lo anterior, estos métodos implican un gran número de detecciones y cuantificaciones falsamente positivas y el número de bacterias detectadas y cuantificadas no es suficientemente fiable.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo método mejorado indirecto y no basado en cultivos para detectar específicamente las bacterias vivas, que supera especialmente las desventajas anteriormente indicadas y que proporciona una detección y cuantificación más fiables del número exacto de bacterias cultivables.

5 Recientemente ha surgido el marcaje de glicanos metabólicos [1] como una herramienta muy potente para estudiar los glicanos de la superficie celular, con aplicaciones que van desde la obtención de imágenes de los mismos en organismos multicelulares vivos, tales como el pez cebra o el ratón, a la identificación de sialoglicoproteínas de superficie celular asociadas a metástasis [2]. Esta estrategia se basa en la asimilación por parte de la maquinaria biosintética celular de un monosacárido modificado que porta un informador químico bio-ortogonal. La incorporación metabólica de este informador en los glicanos puede visualizarse adicionalmente mediante ligación química con un marcaje, tal como una sonda fluorescente. Bastante inesperadamente algunos estudios se han centrado principalmente en el marcaje de glicanos de vertebrados [3] utilizando derivados de monosacáridos comunes, tales como el ácido N-acetil-neuramínico o su precursor N-acetil-manosamina, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina y fucosa.

A pesar del grado mucho más elevado de diversidad de los bloques constructivos monosacáridos y una función esencial en las interacciones bacteria-huésped y la virulencia bacteriana, los polisacáridos bacterianos han sido poco explorados en sus modificaciones estructurales *in vivo*. Las bacterias se dividen en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Mientras que las bacterias Gram-positivas están circundadas por una pared celular de peptidoglicanos, las bacterias Gram-negativas están cubiertas por una capa densa de lipopolisacáridos (LPS) incluidos en su membrana externa y que están implicadas en la integridad estructural de la célula y que con frecuencia se consideran determinantes de la patogenicidad.

25 Un polímero repetitivo de glicano que está contenido en los LPS se denomina antígeno O, polisacárido O o cadena lateral O de las bacterias. El antígeno O está unido al oligosacárido nuclear y comprende el dominio más externo de la molécula de LPS. La composición de la cadena O varía de cepa a cepa. Por ejemplo, existen más de 160 estructuras de antígeno O diferentes producidas por diferentes cepas de *E. coli*. El antígeno O se encuentra expuesto en la superficie más externa de la célula bacteriana. El dominio nuclear contiene en todos los casos un componente oligosacárido que se une directamente al lípido A y comúnmente contiene azúcares tales como heptosa y ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico (también conocido como KDO, ácido cetodesoxioctónico).

Los lipopolisacáridos (LPS) son uno de los polisacáridos de superficie celular más importantes, ya que desempeñan una función estructural clave en la integridad de la membrana externa, y además son un importante mediador de las interacciones de huésped-patógeno.

Otros glicanos bacterianos de la membrana externa de las bacterias comprenden polisacáridos capsulares (CPS), que son lineales y consisten de subunidades repetitivas de monosacáridos y glicoproteínas.

40 Se ha demostrado que las glucoproteínas resultan importantes para la adhesión y la invasión durante la infección bacteriana.

Aunque los LPS aparentemente son dianas interesantes para el marcaje metabólico específico y bien definido de los glicanos en bacterias Gram-negativas, los intentos todavía se han limitado a la introducción de derivados modificados de L-fucosa en una cepa expresamente manipulada genéticamente de *Escherichia coli* [4]. Sin embargo, este último enfoque adolece de algunas limitaciones, ya que:

- (a) la L-fucosa no se encuentra generalmente presente dentro de los LPS de todas las bacterias Gram-negativas, pero se encuentra en los antígenos O de cepas específicas [5],
- (b) la L-fucosa libre no es un producto intermedio en la ruta "*de novo*" de *E. coli* normal y, por lo tanto, seguramente no es directamente activable en un donante de azúcar de nucleótido [6] sin la introducción de manipulaciones genéticas de una ruta alternativa, conocida como "ruta de rescate", en el organismo de interés (manipulación de ruta metabólica), y
- (c) tras la activación en forma de GDP-Fuc, el análogo de L-fucosa modificada puede, tras la inversión de la ruta *de novo*, transformarse en GDP-Man y potencialmente metabolizarse adicionalmente en otros compuestos diversos, siendo el informador químico susceptible ahora de extenderse por otras rutas del metabolismo de los azúcares (o más allá).

Debido a que el marcaje de LPS sobre las bacterias anteriormente indicado requiere, por lo tanto, la modificación genética de las bacterias, no puede utilizarse en un método de detección de bacterias vivas en una muestra analizada según la presente invención.

65 Según la presente invención se ha investigado si podrían utilizarse otros azúcares como diana para la modificación metabólica de los glicanos de por lo menos una categoría dada de bacterias sin requerir la modificación genética de

dichas bacterias, aprovechando el hecho de que la modificación metabólica sería evidencia de viabilidad de las bacterias.

5 Por lo tanto, el método de la presente invención comprende esencialmente detectar bacterias viables en el marcaje de las membranas bacterianas de las mismas mediante la modificación metabólica de los glicanos membranales de las mismas, especialmente los lipopolisacáridos, mediante la incorporación en sus glicanos membranales, especialmente sus LPS, de un componente sacárido modificado que porta un informador químico bio-ortogonal, decorando de esta manera la superficie celular y permitiendo la detección del mismo con una reacción química, especialmente una reacción de química "click", permitiendo además la detección del informador químico, en un procedimiento rápido global, tal como se muestra esquemáticamente en la figura 2B.

15 Según la presente invención se ha encontrado que los azúcares modificados que comprenden un residuo ácido ulosónico o ulosonato resultan particularmente ventajosos en el aspecto de que dichos residuos pueden encontrarse en los glicanos de la membrana bacteriana, especialmente los LPS de todas las bacterias Gram-negativas, y además pueden ser directamente asimiladas en la forma en que serán incorporadas en dichos glicanos, especialmente los LPS de las bacterias Gram-negativas, mientras que la mayoría de los demás azúcares de los LPS proceden de un precursor monosacárido diferente.

20 Los ácidos ulosónicos (también denominados ácidos cetoaldónicos o ácidos aldulosónicos) son monosacáridos de la familia de las cetosas, que presentan una función cetona en C-2, y un ácido carboxílico en C-1. Los ácidos octulosónicos y nonulosónicos se encuentran en diversos glicanos naturales, entre ellos diferentes formas de glicanos bacterianos (especialmente LPS, CPS y glucoproteínas). La ruta biosintética que conduce a la generación de estos glicanos generalmente implica el ácido ulosónico libre como intermediario, que seguidamente se activa directamente en forma de un donante de CMP-azúcar. Lo anterior contrasta con muchos otros monosacáridos que con frecuencia son directamente biosintetizados en forma de donante de azúcar nucleótido difosfato, de un pequeño grupo de donantes activados primarios de monosacáridos simples.

30 La presente invención proporciona un método para marcar específicamente bacterias vivas de una categoría dada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, mediante la incorporación de un primer grupo químico reactivo unido a los glicanos de la membrana externa de dichas bacterias vivas.

Más exactamente, la presente invención proporciona un método para marcar específicamente bacterias vivas de una categoría dada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, comprendiendo el método las etapas de:

- 35 a) incubar dichas bacterias de dicha muestra con por lo menos un análogo de un compuesto monosacárido, siendo dicho monosacárido un residuo monosacárido endógeno de glicanos de la membrana externa de dicha categoría dada de bacterias, comprendiendo dicho residuo monosacárido endógeno un residuo ácido ulosónico o ulosonato, siendo dicho análogo de un compuesto monosacárido, un monosacárido modificado sustituido en una posición dada con un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar con un segundo grupo reactivo de una molécula de marcaje, siendo preferentemente dicha posición dada una posición que comprende un grupo libre en dicho residuo monosacárido endógeno incorporado dentro de dichos glicanos de la membrana externa de las bacterias,
- 40
- 45 b) poner en contacto dichas bacterias con dicha molécula de marcaje que comprende dicho segundo grupo reactivo, a fin de generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo análogo incorporado dentro de dichos glicanos de la membrana externa de dichas bacterias vivas, con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula de marcaje.

50 Las bacterias vivas comprenden bacterias capaces de multiplicarse además de bacterias viables no capaces de multiplicarse. Debido a que la mayoría de las normas sanitarias se refieren al recuento de bacterias capaces de multiplicarse, especialmente capaces de multiplicarse sobre un medio de crecimiento sólido, ventajosamente la presente invención proporciona más particularmente un método para marcar específicamente bacterias capaces de multiplicarse en el que dichas bacterias se incuban en un medio de cultivo en (medio líquido) o sobre (medio sólido), en el que dichas bacterias son capaces de multiplicarse.

55 Preferentemente, el método de la presente invención comprende la etapa adicional de:

60 c) detectar bacterias vivas, mediante la detección de si dichas bacterias comprenden una molécula de marcaje unida a los glicanos de su membrana externa y/o la inmovilización de bacterias vivas que portan dicha molécula de marcaje, sobre un sustrato sólido.

Dicha etapa c) de detección puede llevarse a cabo en un medio líquido o sobre un sustrato sólido.

65 Más particularmente, dicha molécula de marcaje es una molécula detectable que comprende una sustancia detectable o capaz de reaccionar o unirse a una sustancia detectable, o dicha molécula de marcaje es una primera molécula que porta dicho segundo grupo reactivo, siendo capaz dicha primera molécula de reaccionar o unirse a una

segunda molécula y/o a un sustrato sólido, comprendiendo preferentemente dicha segunda molécula una sustancia detectable y/o uniéndose dicha segunda molécula a dicho sustrato sólido.

5 En una primera forma de realización, dicha molécula de marcaje puede ser una molécula detectable, es decir, una molécula que consiste de una sustancia detectable o que porta una sustancia detectable, es decir, una sustancia capaz de ser detectada, tal como un fluorocromo o sustancia luminiscente o un enzima, tal como la peroxidasa, siendo dicho enzima más particularmente detectado tras reaccionar con un correactivo.

10 En una forma de realización particular adicional, útil para aislar bacterias vivas, dicha molécula de marcaje puede unirse a un sustrato sólido al llevar a cabo la etapa b).

15 En una forma de realización particular adicional, dicha molécula de marcaje es una molécula que es un primer ligando o una primera proteína de unión que porta dicho segundo grupo reactivo y en la etapa c) dichas bacterias acopladas a dicho primer ligando o a dicha primera proteína de unión se detectan y/o se inmovilizan poniendo en contacto dicho primer ligando o primera proteína de unión y una segunda molécula que es un segundo ligando o segunda proteína de unión que reacciona o se une específicamente a dicho primer ligando o primera proteína de unión.

20 A continuación, ventajosamente, dicho primer o segundo ligando o proteína de unión puede reaccionar o unirse a una tercera proteína de unión que porta dicha sustancia detectable, tal como un fluorocromo o sustancia luminiscente o un enzima tal como peroxidasa, uniéndose dicha tercera proteína de unión específicamente a dicho primer y/o segundo ligando o proteína de unión. La detección de dicha sustancia detectable mediante dicho segundo ligando o segunda proteína de unión permite amplificar la señal de dicha sustancia detectable.

25 Más particularmente, el primer ligando o primera proteína de unión puede ser:

- biotina, siendo dichas segunda y tercera proteínas de unión avidina o estreptavidina y, respectivamente, un anticuerpo cultivado contra la biotina, o
- 30 - avidina o estreptavidina, siendo dicho segundo ligando y dicha tercera proteína de unión, en este caso, biotina, y, respectivamente, un anticuerpo cultivado contra avidina o estreptavidina, o
- un primer anticuerpo, siendo dicha segunda y tercera proteínas de unión, en este caso, un segundo y tercer anticuerpos específicos para dicho primer anticuerpo.

35 Más particularmente, dicha molécula de marcaje es un primer ligando, preferentemente biotina, que porta dicho segundo grupo reactivo, y en la etapa c), dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando se detectan mediante la reacción de dichas bacterias con un anticuerpo específico para dicho primer ligando, portando dicho anticuerpo una sustancia detectable, preferentemente un fluorocromo o molécula luminiscente, o un enzima.

40 Más particularmente nuevamente, dicha molécula de marcaje es un primer ligando, preferentemente biotina, que porta dicho segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicha primera proteína de unión se inmovilizan mediante la reacción de dicho primer ligando en un sustrato sólido, preferentemente perlas magnéticas, acopladas a dicha segunda proteína de unión, preferentemente avidina o estreptavidina, antes de detectar dichas bacterias vivas mediante amplificación enzimática de ADN bacteriana o mediante reacción de dichas bacterias con una tercera proteína de unión que reacciona o se une específicamente a dicho primer ligando o segunda proteína de unión, portando dicha tercera proteína de unión una sustancia detectable, preferentemente un fluorocromo o molécula luminiscente o un enzima, siendo preferentemente dicha tercera proteína de unión un anticuerpo específico para dicho primer ligando o primera proteína de unión.

50 Dicha forma de realización en la que dichas bacterias vivas se inmovilizan sobre dicho sustrato sólido permite concentrar la muestra en dichas bacterias y cuantificar dichas bacterias vivas mediante cualquier método conocido, incluyendo la amplificación enzimática del ADN, tal como la PCR, especialmente la PCR en tiempo real o un método que implica una reacción inmunológica con un anticuerpo marcado, tal como un ensayo ELISA.

55 Más particularmente, la presente invención proporciona un método para detectar específicamente bacterias vivas de una categoría dada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, siendo dicha molécula de marcaje una molécula detectable que comprende una sustancia detectable, comprendiendo el método la etapa c) de detección de bacterias vivas mediante la detección de si dichas bacterias comprenden dicha molécula detectable unida a los glicanos de su membrana externa.

60 La etapa a) resulta en el marcado específico de todas las bacterias vivas de dicha categoría mediante la incorporación en glicanos, especialmente la capa de lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias vivas, un residuo de dicho análogo de compuesto monosacárido.

65 La etapa b) resulta en la unión de dicha molécula de marcaje al residuo análogo incorporado en dichos glicanos de

bacterias vivas, especialmente LPS, mediante la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho monosacárido modificado dentro de dichos glicanos, especialmente LPS de dichas bacterias cultivadas, con dicha molécula de marcaje que comprende un segundo grupo reactivo, bajo condiciones apropiadas y en presencia de reactantes adecuados apropiados.

5 En la etapa a), preferentemente dicha posición determinada de dichos monosacáridos endógenos es una posición que comprende un grupo libre en dicho residuo monosacárido endógeno incorporado dentro de dichos glicanos de la membrana externa de las bacterias. La expresión "grupo libre" se refiere a una posición no comprometida en un enlace covalente dentro de dichos glicanos, especialmente LPS.

10 El ácido ulosónico o sal ulosonato modificado, al ser asimilado metabólicamente, condujo a la utilización de dicho método para la detección rápida (el procedimiento en total dura menos de un día) de las bacterias Gram-negativas metabólicamente activas/viables. Este método es muy potente ya que la detección de bacterias viables normalmente requiere entre 2 días y más de un mes, según la cepa bacteriana.

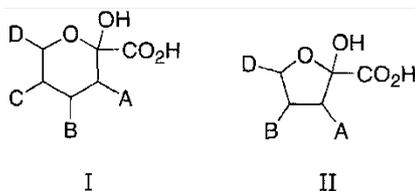
15 Entre las bacterias Gram-negativas se encuentran patógenos severos y la identificación rápida de células viables representa un reto sanitario importante. Por lo tanto, la presente invención proporciona una estrategia simple de marcaje de la superficie celular de las bacterias Gram-negativas metabólicamente activas, mediante la incorporación metabólica de un residuo ácido ulosónico o ulosonato modificado en sus lipopolisacáridos, seguido de la conjugación posterior utilizando química click.

20 La asimilación de un análogo ulosonato exógeno, tal como un análogo KDO, en la célula bacteriana, y su incorporación en los LPS en competencia con su contrapartida endógena, tal como KDO, no resulta evidente en absoluto, ya que estas moléculas son altamente polares y no cruzan las membranas con facilidad. Los intentos de utilizar análogos de KDO como antibacterianos han fracasado debido a la dificultad de alcanzar una concentración intracelular suficiente de estos análogos [10].

25 Más particularmente, el tiempo de incubación en la etapa a) es de entre 1 y 24 h, preferentemente de entre 2 y 12 h, y la concentración de compuesto análogo de monosacárido es de entre 10^{-8} M y 1 M, más particularmente de entre 10^{-5} M y 1 M, para la detección de una concentración de bacterias no superior a 10^{11} células/ml, más particularmente no superior a 10^9 células/ml.

30 En particular, dicho análogo monosacárido es un ácido ulosónico sustituido que presenta una de las fórmulas (I) o (II) proporcionadas a continuación, o una sal ulosonato de las mismas:

35



en las que:

40 - A, B y C pueden ser, independientemente, H, OH, NH_2 , OH y NH_2 , sustituidos o no con grupos protectores de los mismos, preferentemente OH y NH_2 se encuentran sustituidos con grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y

45 - D es una cadena alquilo en C_2 a C_4 , en la que cada carbono se encuentra sustituido o no con OH o NH_2 , en la que OH y NH_2 se encuentran sustituidos o no con grupos protectores de los mismos, en la que preferentemente OH y NH_2 se encuentran sustituidos con grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y

50 - por lo menos uno de los grupos A, B, C o D se encuentra sustituido con dicho primer grupo reactivo.

Dichas dos fórmulas, una con un anillo piranosico (I) y el otro con un anillo furanosico (II) corresponden de hecho a las dos especies que se encuentran naturalmente en equilibrio, aunque generalmente la fórmula (I) es predominante.

55 Más particularmente, para OH el grupo protector preferentemente puede ser un grupo alquilo, hidroxialquilo, acilo o formilo.

Más particularmente, para NH_2 los grupos protectores pueden seleccionarse de entre los grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo.

60 El grupo NH_2 puede protegerse con uno o dos grupos protectores, especialmente un grupo CH_3 y un grupo alquilo,

hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, especialmente acetilo (Ac), acetimidoilo (Am), N-metil-acetimidoilo, N,N-dimetil-acetimidoilo, formilo (Fo) o hidroxibutanoilo.

Más particularmente, dicho análogo de un compuesto monosacárido es un compuesto ácido octulosónico o sal octulosonato sustituido.

Un compuesto octulosónico u octulosonato de fórmula (I) comprende como grupo D una cadena alquilo en C₂.

Un compuesto ácido octulosónico u octulosonato de fórmula (II) comprende como grupo D una cadena alquilo en C₃.

Dicho análogo de compuesto monosacárido también puede ser un compuesto nonulosónico o sal nonulosonato sustituido.

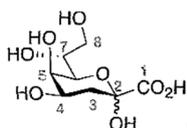
Un compuesto nonulosónico o nonulosonato de fórmula (I) comprende como grupo D una cadena alquilo en C₃.

Un compuesto nonulosónico o nonulosonato de fórmula (II) comprende como grupo D una cadena alquilo en C₄.

Entre los residuos de ácido ulosónico o ulosonato endógenos, son particularmente frente los siguientes, presentes específicamente en las categorías de bacterias siguientes:

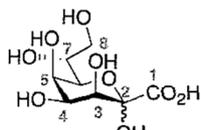
1- residuos de ácido octulosónico u octulosonato de la fórmula (I) siguiente, en la que D es -CHOH-CH₂OH (Ia-1, Ia-2) o -CHOH-CH₂NH₂ (Ia-3):

1.1)



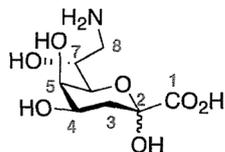
- (Ia-1) Kdo (ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico o ácido cetodesoxioctónico), específico de la categoría siguiente de bacterias: todas las bacterias Gram-negativas. Puede encontrarse en el núcleo interno de LPS de todas las bacterias Gram-negativas excepto en algunas bacterias *Shewenella*, así como en el antígeno O de LPS de las bacterias *Providencia*, *Cronobacter* y *Pseudoalteromonas* y también se encuentra en algunos polisacáridos capsulares (PSC) en *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Rhizobia*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Moraxella nonliquefaciens*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia caribensis* y *Pseudoalteromonas nigrifaciens*.

1.2)



- (Ia-2) Ko (ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulosónico o ácido cetooctónico, (Ia-2) puede encontrarse en la categoría siguiente de bacterias: *Yersinia*, *Acinetobacter* y *Burkholderia*.

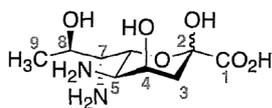
1.3)



- (Ia-3) Kdo8N (ácido 8-amino-3,8-dideoxi-D-mano-oct-2-ulosónico, (Ia-3) puede encontrarse en las bacterias *Schewanella*:

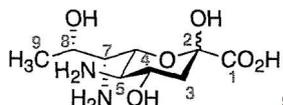
2- Residuos de ácido nonulosónico o nonulosonato de las fórmulas siguientes, en las que D es -CHNH₂-CHOH-CH₃ (Ib-1, Ib-2, Ib-5, Ib-6), -CHOH-CHOH-CH₂OH (Ib-3, Ib-4), -CHNH₂-CHNH₂-CH₃ (Ib-7):

2.1)



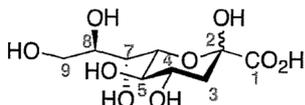
- (Ib-1) 4eLeg (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-D-glicero-D-talo-non-2-ulosónico), (Ib-1) puede encontrarse en el LPS de bacterias *Legionella pneumophila* y en *Schewanella japonica*.

2.2)



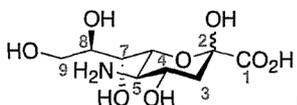
- (Ib-2) 8eLeg (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-D-glicero-D-galacto-non-2-ulosónico), (Ib-2) puede encontrarse en cepas de *E. coli*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia ruckeri*, *Salmonella arizonae*, *Morganella morganii* y *Shewanella putrefaciens*.

2.3)



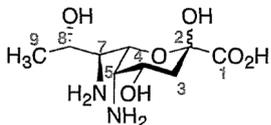
- (Ib-3) Kdn (ácido 3-desoxi-D-glicero-D-galacto-non-2-ulosónico), (Ib-3) puede encontrarse en los PSC de *Klebsiella ozaenae* y *Sinorhizobium fredii* (en forma de 5-O-metil Kdn). Se han encontrado polisacáridos u oligosacáridos que contienen KDN en la pared celular de bacterias Gram-positivas (orden Actinomycetales).

2.4)



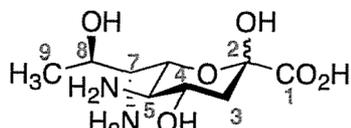
- (Ib-4) Neu (ácido 5-amino-3,5-dideoxi-D-glicero-D-galacto-non-2-ulosónico), (Ib-4) puede encontrarse en los PSC de *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella nonliquefaciens* y *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Streptococcus agalactiae* (Gram+), *Streptococcus suis* (Gram+) y en el antígeno O de LPS de bacterias, incluyendo *Hafnia alvei*, *Escherichia albertii*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Vibrio cholerae*, *Shewanella algae* y en el núcleo de LPS de varios patógenos, incluyendo *N. meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Histophilus somni*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*.

2.5)



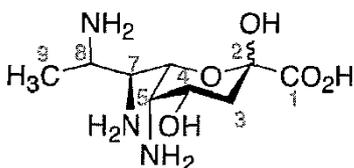
- (Ib-5) Pse (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-L-glicero-L-mano-non-2-ulosónico) (Ib-5) puede encontrarse en el antígeno O (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella boydii*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas distincta*, *Sinorhizobium fredii* y *Vibrio cholerae*, *Pseudoalteromonas atlantica* y la pared celular de *Kribella* spp. 5 (Gram+) y *Actinoplanes utahensis* (Gram+) y el núcleo de LPS de *Vibrio parahaemolyticus* y en glucoproteínas flagelares de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Helicobacter pylori* y *Clostridium botulinum* Gram-positivas y en el PSC de las bacterias *Sinorhizobium*.

2.6)



- (Ib-6) Leg (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-D-glicero-D-galacto-non-2-ulosónico), (Ib-6) puede encontrarse en *Legionella pneumophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens* y *Vibrio salmonicida*.

2.7)



- (Ib-7): ácido 5,7,8-triamino-3,5,7,8,9-pentadesoxi-non-2-ulosónico (configuración desconocida en C-8), puede encontrarse en *Tenacibaculum maritimum* (anteriormente *Flexibacter maritimus*).

En la fórmula anterior Ib-i, con $i=1$ a 7, los grupos NH_2 pueden encontrarse en forma de N-acetilo (NHAc) o pueden encontrarse en forma de N-acetimidoilo (NHAm), N-(N-metilacetimidoilo), N-(N,N-dimetilacetimidoilo), N-formilo (NHFo), NH-hidroxitbutanoilo (NH-Hb) y pueden encontrarse N-metilados adicionalmente o no.

Preferentemente, dicha categoría determinada de bacterias comprende bacterias Gram-negativas y dicho residuo monosacárido endógeno de dicha capa de LPS de la membrana externa de las bacterias es un residuo desoxioctulosonato y dicho análogo de compuesto monosacárido es un compuesto ácido desoxioctulosónico o desoxioctulosonato sustituido (también denominado cetodesoxioctonato, denominado KDO).

La expresión "bacterias Gram-negativas" se refiere a que el método con dicho KDO no permite el marcaje de bacterias Gram-positivas y otras bacterias Gram-negativas que no portan el mismo monosacárido endógeno. En efecto, la totalidad de los LPS de las bacterias Gram-negativas comprende dichos residuos desoxioctulosonato, mientras que no se encuentra comprendido en los glicanos de las bacterias Gram-positivas.

El término "desoxioctulosonato" también denominado Kdo se refiere al residuo sal de ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico de fórmula (Ia-1).

Más particularmente, dicho residuo desoxioctulosonato se encuentra sustituido con dicho grupo reactivo en una posición seleccionada de entre las posiciones 3, 4, 5, 7 o 8 del anillo monosacárido, preferentemente 3, 7 o 8. La posición 2 de dicho monosacárido endógeno se encuentra comprometida en un enlace covalente con el LPS.

La totalidad de las bacterias Gram-negativas comprende dicho residuo desoxioctulosonato que comprende grupos libres que pueden sustituirse con dicho primer grupo reactivo en una de dichas posiciones 3, 4, 5, 7 o 8 de por lo menos un residuo y la totalidad de las bacterias Gram-negativas comprende un grupo libre en la posición 8 de por lo menos un residuo, excepto algunas bacterias *Shewenella*.

Con el fin de detectar específicamente las bacterias Gram-negativas, puede resultar más ventajoso utilizar un medio de cultivo específico para las bacterias Gram-negativas en las etapas a) y b), no permitiendo, por lo tanto, el cultivo de las bacterias Gram-positivas.

Más particularmente, dicho residuo desoxioctulosonato es un compuesto de fórmula (I) o (II), más particularmente de fórmula (Ia-1), sustituido con dicho grupo reactivo R^1 en la posición 8, en la que $\text{D}=\text{-CHOH-CH}_2\text{-R}^1$, $\text{A}=\text{H}$, $\text{B}=\text{OH}$, $\text{C}=\text{OH}$ en la fórmula (I) o $\text{D}=\text{-CHOH-CHOH-CH}_2\text{-R}^1$, $\text{A}=\text{H}$, $\text{B}=\text{OH}$ en la fórmula (II).

Más particularmente, dichas bacterias Gram-negativas que presentan un KDO incorporado endógeno se seleccionan de entre *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estas bacterias presentan KDO endógeno libre en la posición 8.

Otras bacterias patógenas Gram-negativas que presentan por lo menos una de las posiciones de un residuo ácido ulosónico o ulosonato libre pueden seleccionarse de entre *Bacteroides fragilis*, *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* (*Rochalimaea quintana*), *Bartonella* spp. (*Rochalimaea* spp.), *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Brachyspira* spp., *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter* spp., *Cardiobacterium hominis*, *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila caviae*, *Chlamydomphila felis*, *Chlamydomphila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*), *Edwardsiella tarda*, *Ehrlichia* spp., *Eikenella corrodens*, *Elizabethkingia meningoseptica* (*Flavobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium meningosepticum*), *Enterobacter aerogenes* (= *Klebsiella mobilis*), *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* (*Francisella tularensis* var. *palaeartica*), *Francisella tularensis* tipo B), *Fusobacterium necrophorum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus* spp., *Helicobacter pylori*, *Campylobacter pylori*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp., *Legionella bozemanii* (*Fluoribacter bozemanii*), *Legionella pneumophila*, *Legionella* spp., *Leptospira interrogans*, *Leptospira interrogans sensu lato* inclut *Leptospira alexanderi*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira inadai*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira weilii*, *Morganella morganii* (*Proteus morganii*), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Neorickettsia sennetsu* (*Ehrlichia sennetsu*, *Rickettsia sennetsu*), *Pasteurella multocida*, *Pasteurella* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri* (*Proteus rettgeri*), *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia* spp., excluyendo *Orientia* (*Rickettsia*) *tsutsugamushi*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia canadensis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia typhi*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (*Salmonella arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (*Salmonella enteritidis*), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi A* (*Salmonella paratyphi*), *Paratyphi B* y *Paratyphi C*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (*Salmonella typhimurium*), *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, excepto el tipo 1, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema carateum*, *Treponema pallidum*, *Treponema perteneu* (*Treponema pallidum* subsp. *pertenue*), *Treponema* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Brucella melitensis* (*sensu stricto*), *Brucella melitensis* biovar *abortus* (*Brucella abortus*), *Brucella melitensis* biovar *canis* (*Brucella canis*), *Brucella melitensis* biovar *suis* (*Brucella suis*),

Brucella abortus (*Pseudomonas mallei*), *Burkholderia pseudomallei* (*Pseudomonas pseudomallei*), *Chlamydia psittaci* (*Chlamydia psittaci*), *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (*Francisella tularensis* subsp. *nearctica*, *Francisella tularensis* biovar *tularensis*, *Francisella tularensis* tipo A), *Orientia tsutsugamushi* (*Rickettsia tsutsugamushi*), *Rickettsia akari*, *Rickettsia canadensis* corrig, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia montanensis* corrig, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi* (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* tipo 1, *Yersinia pestis*).

En otra forma de realización preferente, el método según la invención es para el marcaje, preferentemente la detección, de específicamente bacterias *Legionella pneumophila* vivas y dicha categoría determinada de bacterias es la categoría de las bacterias *Legionella pneumophila* y dicho residuo monosacárido endógeno de dicha capa de LPS de la membrana externa de las bacterias es un residuo ácido 4-epilegionamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-D-glicero-D-talo-non-2-ulosónico) o 4-epilegionaminato, o un residuo ácido legionamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-D-glicero-D-galacto-non-2-ulosónico) o legionaminato, y dicho análogo de un compuesto monosacárido es, respectivamente, un compuesto ácido 4-epilegionamínico o 4-epilegionaminato sustituido, o un compuesto ácido legionamínico o legionaminato sustituido, preferentemente sustituido en una posición seleccionada de entre las posiciones 3, 4, 5, 7, 8 y 9 del anillo monosacárido, preferentemente 5, 7 y 9. La posición 2 de dicho monosacárido endógeno se encuentra comprometida en un enlace covalente con el LPS.

Preferentemente, dicho análogo de un compuesto monosacárido es un compuesto ácido 4-epilegionamínico o 4-epilegionaminato sustituido de fórmula (I), más particularmente (Ib-1) o un compuesto ácido legionamínico o legionaminato sustituido de fórmula (I), más particularmente (Ib-6), sustituido con dicho grupo reactivo R^1 en la posición 9, en la que $D=-CHNH_2-CHOH-CH_2R_1$, $A=H$, $B=OH$ y $C=NH_2$.

Otra estructura preferida de dicho análogo de un compuesto monosacárido es un compuesto ácido 4-epilegionamínico o 4-epilegionaminato sustituido de fórmula (I), más particularmente (Ib-1) o un compuesto ácido legionamínico o legionaminato sustituido de fórmula (I), más particularmente (Ib-6), sustituido con dicho grupo reactivo R_1 en, por lo menos, una de las posiciones 5 y 7, en el que $D=-CHNHR_2-CHOH-CH_3$, $A=H$, $B=OH$ y $C=NHR_3$, siendo R_2 y R_3 , independientemente uno de otro, H o R_1 .

En otra forma de realización preferida, el método según la invención es para el marcaje, preferentemente la detección, de específicamente bacterias *Pseudomonas aeruginosa* vivas y dicha categoría determinada de bacterias es la categoría de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y dicho residuo monosacárido endógeno de dicha capa de LPS de la membrana externa de las bacterias es un residuo ácido 8-epilegionamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-L-glicero-D-galacto-non-2-ulosónico) o 8-epilegionaminato o un residuo ácido pseudamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-L-glicero-L-mano-non-2-ulosónico) o pseudaminato, y dicho análogo de un compuesto monosacárido es, respectivamente, un ácido 8-epilegionamínico o 8-epilegionaminato sustituido, o un compuesto ácido pseudamínico o pseudaminato sustituido, preferentemente sustituido en una posición seleccionada de entre las posiciones 3, 4, 5, 7, 8 y 9 del anillo monosacárido, preferentemente 5, 7 y 9. La posición 2 de dicho monosacárido endógeno se encuentra comprometida en un enlace covalente con el LPS.

Preferentemente, dicho análogo de un compuesto monosacárido es un compuesto ácido 8-epilegionamínico o 8-epilegionaminato sustituido de fórmula (I), más particularmente (Ib-2), o un compuesto ácido pseudamínico o pseudaminato sustituido de fórmula (I), más particularmente (Ib-5), sustituido con dicho grupo reactivo R_1 en la posición 9, en la que $D=-CHNH_2-CHOH-CH_2R^1$, $A=H$, $B=OH$ y $C=NH_2$.

Otra estructura preferida de dicho análogo de un compuesto monosacárido es un compuesto ácido 8-epilegionamínico o 8-epilegionaminato sustituido de fórmula (I), más particularmente (Ib-2), o un compuesto ácido pseudamínico o pseudaminato sustituido de fórmula (I), más particularmente (Ib-5), sustituido con dicho grupo reactivo R_1 en, por lo menos, una de las posiciones 5 y 7, en la que $D=-CHNHR_2-CHOH-CH_3$, $A=H$, $B=OH$ y $C=NHR_3$, en la que R_2 y R_3 son, independientemente uno de otro, H o R_1 .

Más particularmente, dicha sustancia detectable es un fluorocromo o molécula luminiscente detectable mediante fluorescencia o luminiscencia.

Preferentemente, dicho primer grupo reactivo R_1 se selecciona de entre los grupos que consisten de o que portan el grupo azido ($-N_3$) y grupos que consisten de o que portan el grupo alquino ($-C\equiv C-$) y dicho segundo grupo reactivo R_2 se selecciona de entre grupos que consisten de o portan los grupos alquino ($-C\equiv C-$) y azido ($-N_3$), respectivamente, y la reacción de dicho grupo reactivo azido con dicho grupo alquino ($-C\equiv CH$) se lleva a cabo al llevar a cabo una cicloadición entre azida y alquino.

La cicloadición entre azida y alquino es una reacción bien conocida de la denominada química click en presencia de un catalizador de cobre, en la que el grupo azida reacciona con el grupo alquino, proporcionando un triazol.

Más particularmente, la reacción se lleva a cabo bajo condiciones catalizadas por cobre en presencia de un ligando tris-triazolilo, preferentemente TGTA.

Más particularmente, la molécula detectable es un fluoróforo que porta un grupo alquino terminal.

Más particularmente, el análogo de KDO que sustituye el ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico endógeno incorporado en la capa de LPS de la membrana externa de las bacterias es un análogo Kdo-N₃ (ácido 8-azido-3,8-dideoxi-D-mano-octulosónico) que reacciona en presencia de un ligando tris-triazol, tal como TGTA (tris((1-(β-D-glucopiranosil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-il)metil)amina) o TBTA (tris-[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metil]amina) y una molécula de fluoróforo de marcaje Alexa que porta un grupo alquino terminal con un catalizador, de manera que se lleve a cabo una cicloadición entre azida y alquino de dicho fluoróforo y dicho Kdo-N₃.

Otros ligandos apropiados utilizados frecuentemente son: tris(3-hidroxiopropiltriazolilmetil)amina (THPTA), ácido 2-(4-((bis((1-terc-butil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etanosulfónico (BTES), tris((1-((O-etil)carboximetil)-(1,2,3-triazol-4-il))metil)amina, disulfonato de batofenantrolina o tris(2-bencimidazolilmetil)aminas (53).

Otros grupos reactivos y otras reacciones son posibles, tales como: la ligación de Staudinger (primer grupo reactivo=azida y segundo grupo reactivo=fosfina), reacción click sin cobre (primer grupo reactivo=azida y segundo grupo reactivo=alquino restringido (alquino intracíclico)), condensación de carbonilos (primer grupo reactivo=aldehído o cetona y segundo grupo reactivo=hidrazida u oxiamina), etiqueta de His (primer grupo reactivo=oligo-histidina y segundo grupo reactivo=complejo de níquel o ligando de níquel), reacción click de tiol-eno (primer grupo reactivo=tiol y segundo grupo reactivo=alqueno), reacción click de nitrilo-óxido-eno (primer grupo reactivo=óxido de nitrilo o aldehído, oxima o cloruro de hidroximoilo o cloroxima y segundo grupo reactivo=alqueno o alquino), reacción click de nitrilo imina-eno (primer grupo reactivo=nitrilo-imina o aldehído, hidrazona o cloruro de hidrazonoilo o clorohidrazona y segundo grupo reactivo=alqueno o alquino), ligación de Diels-Alder de demanda inversa de electrones (primer grupo reactivo=alqueno y segundo grupo reactivo=tetrazina), acoplamiento de Suzuki-Miyaura (primer grupo reactivo=haluro de arilo y segundo grupo reactivo=boronato de arilo).

En el listado anteriormente indicado de grupos participantes en las reacciones, el primer grupo reactivo y el segundo grupo reactivo pueden permutarse.

Puede obtenerse otro tipo de detección y de mayor especificidad al incubar la muestra de bacterias con dos compuestos análogos de monosacárido diferentes de entre los indicados y dos moléculas detectables diferentes.

En otra forma de realización particular del método de la presente invención, dicha incubación de la etapa a) y la reacción de la etapa b) se llevan a cabo sobre un filtro de membrana de manera que las bacterias cultivadas que se generan a partir de la misma bacteria original que se ha multiplicado se agrupan juntas y pueden visualizarse con un microscopio y dicha molécula detectable puede detectarse mediante visualización con dicho microscopio. Por lo tanto, de esta manera puede cuantificarse el número de bacterias cultivables.

La presente forma de realización permite filtrar la muestra sometida a ensayo en dicho filtro de membrana, tal como una membrana de poliéster, antes de la asimilación de dicho monosacárido modificado para evitar la sobreestimación de bacterias viables debido al posible crecimiento durante el periodo de asimilación. En efecto, cuando las células fijas sobre la superficie de dicha membrana empiezan a crecer, se mantienen juntas y forman una microcolonia que puede detectarse fácilmente como procedente de la misma célula individual. Por lo tanto, lo anterior permite la cuantificación mediante el recuento de las bacterias cultivables.

La presente invención proporciona además un kit para llevar a cabo el método de la invención, que comprende:

- dicho análogo de un compuesto monosacárido que comprende un compuesto ácido ulosónico o ulosonato sustituido en una posición dada por dicho primer grupo químico reactivo, y
- dicha molécula de marcaje que comprende dicho segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y
- reactantes para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo análogo incorporado dentro de dicho glicanos de la membrana externa de dichas bacterias con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula de marcaje, y
- un medio de cultivo o incubación que permite el crecimiento de dicha categoría dada de bacterias, preferentemente específicas para el crecimiento de dicha categoría determinada de bacterias.

Preferentemente, dicho medio de cultivo o incubación comprende además agentes que potencian y/o aceleran la velocidad de crecimiento y/o la capacidad de formación de colonias de dicha categoría determinada de bacterias. Más particularmente, el medio de incubación comprende por lo menos un agente antioxidante, tal como piruvato o catalasa.

Más particularmente, en una forma de realización, el kit comprende además:

- dicha molécula detectable o dicha segunda molécula que porta una sustancia detectable, preferentemente un fluorocromo o molécula luminiscente o un enzima, y/o

- 5
- un sustrato sólido que porta dicha segunda molécula capaz de reaccionar o unirse específicamente con dicha molécula de marcaje.

Más particularmente, en una forma de realización, el kit de la presente invención comprende además:

- 10
- dicha molécula detectable que comprende dicho segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y

- un medio sólido que permite la visualización de las bacterias tras incubar con dicho análogo de un compuesto monosacárido, dichos reactantes y dicha molécula detectable.

- 15
- Más particularmente nuevamente, el kit comprende:

- siendo dicho análogo de un compuesto monosacárido un compuesto ácido desoxioctulosónico o sal desoxioctulosonato sustituido con dicho primer grupo reactivo que comprende un grupo azido o alquino, y

- 20
- portando dicho segundo grupo reactivo de la molécula detectable un alquino o, respectivamente, un grupo azido, y

- comprendiendo dichos reactantes un catalizador de cobre y un ligando tris-triazolilo.

- 25
- Resultarán evidentes otras características y ventajas de la presente invención a partir de la descripción detallada siguiente, referida a las figuras siguientes, en las que:

- 30
- la figura 1A muestra la estructura del componente principal del lipopolisacárido de *E. coli* K12, con el residuo sacárido KDO incorporado dentro del NI, el núcleo interno de los LPS de las bacterias Gram-negativas entre el NO, el núcleo externo y el LA, el lípido A, mostrando el sitio de anclaje A para el antígeno O y el posible sitio de modificación B de KDO en la posición 8; Glc: D-glucosa; GlcN: 2-amino-2-desoxi-D-glucosa; KDO: 3-desoxi-D-mano-octulosonato; Hep: L-glicero-D-mano-heptosa; Gal: D-galactosa.

- 35
- La figura 1B muestra la ruta de biosíntesis de KDO (ruta de KDO),

- la figura 2A muestra las moléculas utilizadas en el presente ejemplo (1=KDO-N₃, 2=TGTA; 3=A488-ino),

- 40
- la figura 2B muestra una representación esquemática del marcaje metabólico de LPS de *E. coli* con 1=KDO-N₃,

- la figura 3A representa una fotografía de *E. coli* K12 con KDO-N₃ incorporado metabólicamente (+KDO-N₃) y sin KDO incorporado metabólicamente (-KDO-N₃) antes de ser revelado mediante una reacción click catalizada por A488-ino-Cu(I) tras 5 minutos (en gris) y después de ser revelado (en negro),

- 45
- la figura 3B representa un gráfico de la distribución de frecuencias de los valores de fluorescencia bacteriana generados y representados con (columnas grises) o sin (columnas negras) adición de KDO-N₃, siendo la unidad arbitraria de fluorescencia ("u.a.f.") de entre 0 y 1.300 en el eje de abscisas y siendo el intervalo de frecuencia relativa ("f.r.") de entre 0 y 1,

- 50
- la figura 3C es una fotografía que muestra la fluorescencia concentrada en la superficie celular de *E. coli* marcado mediante reacción click catalizada por A488-ino-Cu(I) durante 5 min., tras deconvolución de la imagen aplicando el algoritmo de Richardson-Lucy con una fusión de la extensión de punto experimental,

- 55
- la figura 4 son fotografías que representan la detección de KDO-N₃ incorporado metabólicamente por diversas cepas bacterianas; el KDO-N₃ incorporado metabólicamente por diversas bacterias se reveló mediante reacción click catalizada por A488-ino-Cu(I) tras 60 min. Imágenes de contraste de fases y de fluorescencia (panel izquierdo) sin adición de KDO-N₃ (panel derecho) y con adición de KDO-N₃ (panel derecho). Escala de barras de 1 μm tal como en la figura 3A (bacterias con adición de KDO-N₃ (+KDO-N₃) y sin adición de KDO (-KDO-N₃)), antes del revelado mediante reacción click catalizada por A488-ino-Cu(I) tras 5 minutos en gris y tras el revelado en negro, y

- 60
- la figura 5 representa los resultados (fotografías y gráficos) de la detección de KDO-N₃ incorporado metabólicamente por diversas cepas bacterianas. El KDO-N₃ incorporado metabólicamente por diversas cepas bacterias se reveló mediante reacción click catalizada por A488-ino-Cu(I) tras 60 min. Se generó una distribución de frecuencias de los valores de fluorescencia bacteriana y se representó en un gráfico con

- 65

adición de KDO-N₃ (columnas grises) o sin adición (columnas negras).

La descripción a continuación es la descripción de un ejemplo ilustrativo de marcaje click de membranas bacterianas de bacterias Gram-negativas mediante modificación metabólica del núcleo interno de LPS con KDO modificado.

Las bacterias Gram-negativas viables pueden incorporar específicamente un KDO modificado en sus lipopolisacáridos, decorando la superficie celular con un informador químico bio-ortogonal. Las reacciones click permiten el marcaje adicional de las células viables, en un procedimiento rápido global tal como se muestra esquemáticamente en la figura 1.

Ejemplo 1: asimilación de ácido 8-azido-3,8-dideoxi-D-mano-octulosónico (KDO-N₃) y detección específica de bacterias Gram-negativas

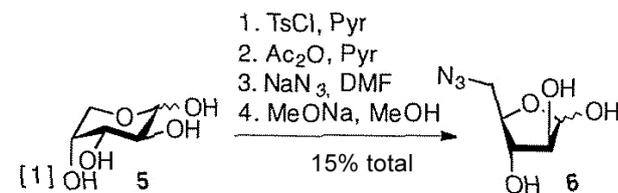
1) De entre todas las dianas potenciales, el ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO) aparentemente es un candidato muy atractivo. En efecto, el KDO es un componente específico y esencial del núcleo interno de LPS [7,8] y durante mucho tiempo se ha considerado que se encuentra presente en los LPS de prácticamente la totalidad de las especies Gram-negativas (así como en plantas superiores y algas), en donde por lo menos un residuo se encuentra directamente conectado con el lípido A (figura 1A) [9]. Debido a su importancia vital, el KDO ha sido considerado determinante para la caracterización de las bacterias Gram-negativas y la ruta de KDO, una diana potencial para el desarrollo de nuevos antibacterianos [10]. En esta ruta (figura 1B), la arabinosa-5-P se condensa con PEP, conduciendo a la formación de KDO-8-P, que seguidamente se transforma en KDO libre, y es activado adicionalmente en forma del donante CMP-KDO, antes de la generación de los LPS.

Por todos estos motivos, se ha investigado si esta ruta de KDO, al ser una ruta específica de los LPS, podría ser suficientemente tolerante para incorporar un KDO modificado, tal como 8-azido-8-desoxi-KDO (1, figura 2A) en el núcleo de los LPS de *E. coli*, y potencialmente en otras bacterias Gram-negativas. Dada la presencia de KDO libre como intermediario en la ruta, los presentes inventores plantearon que, si la penetración celular de dicho análogo de KDO fuese suficiente [11], potencialmente podría ser activado directamente, sustituir parcialmente el KDO endógeno en los LPS y detectarse sobre la superficie celular mediante reacción click de azida-alquino (figura 2B) [12]. Además, la modificación de la posición C-8 de KDO con un grupo azido bio-ortogonal podría evitar el metabolismo inverso por la KDO-8-P fosfatasa (3.1.3.45), limitando la potencial diseminación del informador químico hacia otros carbohidratos y metabolitos.

Entre las muchas estrategias sintéticas multietapa potenciales disponibles para obtener ácido 8-azido-3,8-dideoxi-D-mano-octulosónico 1 [13], este compuesto ha sido preparado de una manera sencilla (Esquema 1) [14] adaptada del enfoque descrito en 1963 por Ghalambor y Heath para la síntesis directa de KDO [15]. Es decir, se condensa 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa [16] (6) con oxaloacetato sódico (7), conduciendo, tras la descarboxilación bajo condiciones ligeramente ácidas, a KDO-N₃ (1), que se aisló en forma de su sal amónica con un rendimiento de 57% (86% basado en el 6 recuperado). El precursor 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa 6 pudo obtenerse siguiendo una estrategia muy directa, simple y con ahorro de tiempo a partir de D-arabinosa comercial, tal como se indica posteriormente en la presente memoria.

1a) Síntesis de 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa amónica 6

El precursor 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa 6 pudo obtenerse siguiendo una estrategia muy directa, simple y con ahorro de tiempo, evitando la utilización alternativa de una voluminosa protección temporal con tritilo: se tosilo directamente la D-arabinosa comercial en la posición primaria en sus formas furanósicas, se acetiló después y se sometió a desplazamiento nucleofílico mediante anión azida sin purificación intermedia. En esta etapa el producto pudo separarse fácilmente de cualquier otro producto secundario mediante cromatografía flash. La desacetilación final proporcionó 6 con un rendimiento total del 15%.



Esquema 1. Síntesis de 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa amónica 6

5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa (6)

Se calentó D-arabinosa 5 comercial (6,00 g, 40 mmoles) a 100°C durante 2 horas en piridina (40 ml). Se dejó que la solución se enfriase, se trató además con cloruro de tosilo (8,38 g, 44 mmoles, 1,1 equiv.) y se agitó durante 16

horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió anhídrido acético (20 ml). Tras completar la acetilación, determinada mediante cromatografía en capa fina (CCF), se evaporaron los solventes y las trazas residuales se coevaporaron varias veces con tolueno. El residuo se disolvió en DMF (100 ml), se añadió NaN₃ (5,20 g, 80 mmoles, 2 equiv.) y la suspensión se calentó a 80°C durante 20 horas. Tras la dilución con acetato de etilo y el lavado con agua, se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (éter de petróleo/acetato de etilo 7:3). El primer producto eluido se determinó que era la 5-azido-1,2,3-tri-O-acetil-D-arabinofuranosa esperada (1,83 g, 15%, $\alpha/\beta \sim 2:1$). EMBR (IEP⁺) 324,0 [M+Na]⁺; EMAR (IEP⁺) calculado para [C₁₁H₁₅N₃NaO₇]⁺: 324,0802, observado: 324,0802; RMN-¹H (CDCl₃, 360 MHz) δ (ppm): 6,41 (d, 0,33H, J_{1,2}~3,5 Hz, H-1 β), 6,23 (d, 0,67H, H-1 α), 5,40-5,37 (m, 1,34H, H-2 β , H-3 β), 5,23 (d, 0,67H, J_{1,2}~1 Hz, H-2 α), 5,06 (d, 0,67H, J_{3,4} 4,6 Hz, H-3 α), 4,30 (ddd, 0,67H, H-4 α), 4,16-4,10 (m, 0,33H, H-4 β), 3,69 (dd, 0,67H, J_{4,5a} 3,1 Hz, J_{5a,5b} 13,5 Hz, H-5a α), 3,61 (dd, 0,33H, J_{4,5a} 3,6, J_{5a,5b} 13,1 Hz, H-5a β), 3,51-3,43 (m, 1H, H-5b α , H-5b β), 2,15, 2,13, 2,12, 2,11, 2,11, 2,09 (6s, 18H, 6 CH₃CO); RMN-¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz) δ (ppm): 170,3, 170,0, 169,1, (OC(O)CH₃), 99,2 (C-1 α), 93,5 (C-1 β), 84,1 (C-4 α), 80,8 (C-4 β), 80,6 (C-3 α), 77,4 (C-2 α), 75,1 (C-2 β), 74,8 (C-3 β), 53,0 (C-5 β), 51,3 (C-5 α), 20,9, 20,6, 20,3 (OC(O)CH₃).

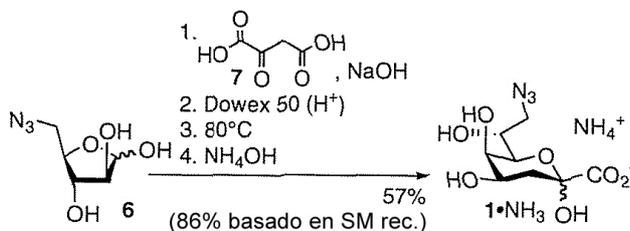
1b) A continuación, se disolvió 5-azido-1,2,3-tri-O-acetil-D-arabinosa protegida en metanol anhidro (30 ml), se trató con una solución metanólica de MeONa (0,2 moles-l⁻¹, 3 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h bajo una atmósfera de argón. Tras la neutralización (Dowex 50 (H⁺)), la filtración y la concentración, se obtuvo 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa 6 con un rendimiento de 99% (1,03 g). EMBR (IEP⁺) 198,0 [M+Na]⁺, 40%, 230 [M+MeOH+Na]⁺, 100%; EMAR (IEP⁺) calculada para [C₅H₉N₃NaO₄]⁺ 198,0485, observado: 198,0485; RMN-¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm): 5,20 (d, 0,45H, J_{1,2} 3 Hz, H-1 β), 5,16 (d, 0,55H, J_{1,2} 3 Hz, H-1 α), 4,12-4,05 (m, 0,55H, H-4 α), 4,02-3,85 (m, 2H, H-2 α , H-2 β , H-3 α , H-3 β), 3,84-3,76 (m, 0,45H, H-4 β), 3,56 (dd, 0,55H, J_{5a,5b} 13,5, J_{4,5a} 3,0 Hz, H-5a α), 3,51 (dd, 0,45H, J_{5a,5b} 13,0 Hz, J_{4,5a} 3,5 Hz, H-5a β), 3,35 (dd, 0,55H, J_{4,5b} 6,5 Hz, H-5b α), 3,33 (dd, 0,45H, J_{4,5b} 6,5 Hz, H-5b β), RMN-¹³C (D₂O, 75 MHz) δ (ppm): 101,1 C-1 α , 95,3 C-1 β , 81,4, 81,3, 79,7, 76,4, 75,9 y 74,8 C-2 α , 2 β , 3 α , 3 β , 4 α , 4 β ; 52,7 C-5 β ; 51,6, C-5 α .

1c) Síntesis de 8-azido-3,8-dideoxi-D-mano-octulosonato amónico (1·NH₃).

Se añadió una solución fría (4°C) de 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa 6 (437 mg, 2,5 mmoles) en agua (2,1 ml) a una solución de ácido oxaloacético (528 mg, 4,0 mmoles) en agua (2,5 ml), el pH de la cual había sido ajustado a ~11 mediante la adición de NaOH acuoso (10 M). Tras agitar durante dos horas a temperatura ambiente, se neutralizó la solución (Dowex 50 (H⁺)), se filtró y se calentó durante 20 min. a 80°C.

Tras ajustar el pH a ~7 con AcOH (0,5 M), la mezcla se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico (Dowex 1X8 (HCO₂⁻)). La elución inicial con agua proporcionó 6 no reaccionado (150 mg, 34%). La elución adicional con un gradiente de concentraciones de ácido fórmico (0,5 moles·l⁻¹ → 2 moles·l⁻¹), liofilización, tratamiento con una resina Dowex 50 (H⁺) y neutralización con amonio (0,2 moles·l⁻¹), proporcionó, tras la concentración, 8-azido-3,8-dideoxi-D-mano-octulosonato amónico (1·NH₃, 400 mg, 57%).

Rf 0,38 (alcohol isopropílico/agua 9:1). EMBR (IEP⁺) 262,1 [M-H]⁺, 100%; 525,1 [2M-H]⁺, 5%; 547,1 [2M-2H+Na]⁺, 10%; EMAR (IEP⁺) calculado para [C₈H₁₂N₃O₇]- 262,0681, observado: 262,0667. IR v (cm⁻¹)=3210, 2111 (N₃), 1604, 1401, 1077. RMN de 1, en forma de KDO libre y derivados, se ve complicado por la presencia de múltiples formas (por ejemplo α -piranosa (α p, 58%), β -piranosa (β p, 4%), α -furanosa (α f, 24%), β -furanosa (β f, 14%)). Datos de RMN seleccionados: RMN-¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm): 3,56 (dd, J_{8a,8b} 13,2, J_{7,8a} 2,4 Hz, H-8a α p); 3,39 (dd, J_{7,8b} 6,0 Hz, H-8b α p); 2,55 (dd, J_{3a,3b} 14,3 Hz, J_{3a,4} 7,2 Hz, H-3a α f); 2,33 (dd, J_{3a,3b} 13,1, J_{3a,4} 6,6 Hz, H-3a β f); 2,26 (dd, J_{3b,4} 7,3 Hz, H-3b β f); 2,03 (dd, J_{3b,4} 3,6, H-3b α f); 1,94 (dd, J_{3a,3b} 12,7, J_{3a,4} 12,7 Hz, H-3a α p); 1,84 (dd, J_{3b,4} 4,9 Hz, H-3b α p); 1,71 (dd, J_{3a,3b}~J_{3b,4} 12,0 Hz, H-3b β p); RMN-¹³C (D₂O, 100 MHz) δ (ppm): 176,4 (C-1 α p), 104,1 (C-2 α f), 96,2 (C-2 α p), 85,3 (C-5 α f), 71,5, 68,0, 66,3 y 66,0 (C-4 α p, 5 α p, 6 α p, 7 α p), 53,8 (C-8 α p), 44,6 (C-3 α f), 33,5 (C-3 α p).



Esquema 2. Síntesis de 8-azido-3,8-dideoxi-D-mano-octulosonato amónico

2) Se cultivó durante la noche *E. coli* K12 no patógenas, las cuales carecen del antígeno O [17], en presencia de KDO-N₃ (1), tal como se indica en el párrafo siguiente 3), y se trataron adicionalmente, durante un experimento de curso temporal, aplicando condiciones de química click catalizadas por cobre optimizadas [18] tal como se indica en el párrafo 2a) siguiente, en presencia de un ligando tris-triazolilo derivado de glucosa (2) [19] y un

fluoróforo Alexa Fluor 488 que porta un grupo alquino terminal (3). Tras 5 minutos de incubación, se observó un marcaje muy brillante de las bacterias, mientras que en los experimentos de control (en ausencia del análogo de KDO-N₃) no se observó ninguna señal (figura 3A, B). Se midió la fluorescencia tal como se indica en el párrafo 2b), posteriormente. La fluorescencia era más evidente en torno a la periferia celular, sugiriendo que la membrana resultaba marcada preferentemente, tal como se esperaba (figura 3C).

2a) Reacción click catalizada por cobre

Se diluyeron cultivos de durante la noche 1.000 veces en medio fresco (volumen final: 100 µl) que contenían KDO-N₃ (4 mM). Las bacterias se incubaron a 37°C durante 12 horas y después se lavaron 3 veces con tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5) mediante centrifugación a 13.000xg durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Se mezclaron CuSO₄ y TGTA, a una concentración final de 2 mM y 4 mM, respectivamente, durante la noche en un tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5) a 37°C bajo agitación vigorosa. A continuación, se añadió aminoguanidina, ascorbato sódico y A488-ino a concentraciones finales de 4 mM, 5 mM y 0,13 mM, respectivamente, a la mezcla de durante la noche de CuSO₄/TGTA. Finalmente, se resuspendieron las bacterias en dicha solución. Tras 5, 30, 60 o 180 minutos, las células se lavaron 3 veces con tampón de fosfato mediante centrifugación a 13.000xg durante 1 minuto a temperatura ambiente y se analizaron mediante microscopía.

2b) Microscopía de fluorescencia

Se inocularon las bacterias sobre cubreobjetos de vidrio y después se cubrieron con una almohadilla delgada (1 mm de grosor) semisólida de agar al 1% preparada con LB diluido (1/10 en tampón de fosfato). Se registraron imágenes con un microscopio de epifluorescencia automatizado (Nikon TE2000-E-PFS, Nikon, Francia), dotado de una cámara CoolSNAP HQ 2 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, Francia) y un objetivo 100x/1,4 DLL. Se emitió luz de excitación con una luz de haluro metálico de 120 W y se realizó un seguimiento de la señal utilizando filtros apropiados. Se llevó a cabo el análisis digital y el procesamiento de las imágenes con una secuencia de comandos de automatización (Visual Basic) en Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Molecular Devices France, Francia), tal como se ha descrito previamente [50, 51].

3) Para consolidar adicionalmente este enfoque, se sometió a ensayo su eficiencia y especificidad en tres otras bacterias Gram-negativas que utilizan KDO (*E. coli* O86, *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila* cepa Paris), así como tres controles negativos, incluyendo *Shewanella oneidensis*, que recientemente se ha demostrado que utiliza 8-amino-8-desoxi-KDO en lugar de KDO [21] y dos bacterias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), que no producen KDO [22].

Las cebras bacterianas y condiciones de cultivo fueron las siguientes. *E. coli* K12, *E. coli* O86 y *S. typhimurium* 12023 fueron cultivadas en medio M9 (que contenía además: ácido casamino 0,2%, glucosa 0,2%, CaCl₂ 1 mM y MgSO₄ 5 mM); *S. oneidensis*, *B. subtilis* y *S. aureus* fueron cultivadas en medio de Luria-Bertani (LB), y *L. pneumophila* sp. Paris fue cultivada en medio de extracto de levadura complementado con L-cisteína, pirofosfato férrico y α-cetoglutarato (YEC). Todas las cepas fueron cultivadas en un agitador giratorio (160 rpm) a 37°C, excepto *S. oneidensis*, que se cultivó a 28°C.

Tal como se esperaba, las dos cepas de *E. coli*, *S. typhimurium* y *L. pneumophila* Paris mostraron un marcaje de la superficie celular eficiente y bien definido, mientras que no se observó marcaje en *S. oneidensis* o en las bacterias Gram-positivas debido a que estas bacterias no presentan KDO en su superficie celular (figuras 4 y 5).

4) Incubación y reacción sobre filtros de membrana.

Las muestras que contenían bacterias se filtraron a través de filtros de membrana de poliéster negros de 25 mm de 0,45 µm de tamaño de poro. Las membranas individuales se colocaron sobre almohadillas de celulosa (25 mm) empapadas en 650 µl de caldo nutritivo (según la bacteria de interés pueden utilizarse diferentes caldos nutritivos) complementado con 0,5% de piruvato o catalasa (protege frente al efecto tóxico del oxígeno) y KDO-N₃ (4 mM) en placas de Petri. Se incubaron las placas de Petri que contenían las muestras a 37°C durante un periodo determinado (según la bacteria de interés).

A continuación, se mezcló durante la noche CuSO₄ y TGTA, a una concentración final de 2 mM y 4 mM, respectivamente, en un tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5) a 37°C bajo agitación vigorosa. A continuación, se añadió aminoguanidina, ascorbato sódico y A488-ino a concentraciones finales de 4 mM, 5 mM y 0,13 mM, respectivamente, a mezcla de CuSO₄/TGTA de durante la noche.

Finalmente, se colocaron membranas individuales sobre almohadillas de celulosa empapadas en 650 µl de dicha solución en placas de Petri y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se registraron imágenes con un microscopio de epifluorescencia automatizado (Nikon TE2000-E-PFS, Nikon, Francia) dotado de una cámara CoolSNAP HQ 2 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, Francia) y un objetivo

100x/1,4 DLL. La luz de excitación se emitió con una luz de haluro metálico de 120 W y se realizó un seguimiento de la señal utilizando los filtros apropiados. El análisis digital y el procesamiento de imágenes se llevaron a cabo con una secuencia de comandos de automatización (Visual Basic) en Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Molecular Devices France, Francia), tal como se ha indicado anteriormente [50, 51].

5) En conclusión, se ha demostrado que el análogo de KDO puede ser metabólicamente asimilado e incorporado en los LPS sin necesidad de utilizar bacterias modificadas genéticamente. Resulta más interesante el hecho de que el KDO modificado en primer lugar necesita ser asimilado metabólicamente, conduciendo a la utilización de dicho método para la detección rápida (el procedimiento en total requiere menos de un día) de bacterias Gram-negativas metabólicamente activas/viables. Esta última aplicación resulta muy potente con respecto al hecho de que la detección de las bacterias viables normalmente requiere entre 2 días y más de un mes, según la cepa bacteriana.

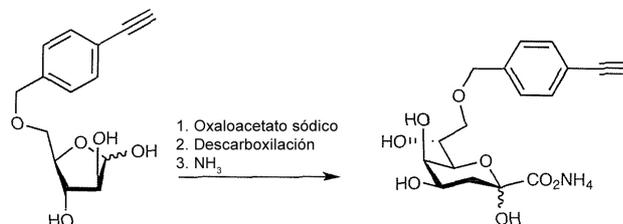
Existen varios patógenos entre las bacterias Gram-negativas, y la identificación rápida de células viables representa un importante reto sanitario. Por lo tanto, la presente invención proporciona una estrategia simple para marcar la superficie celular de las bacterias Gram-negativas metabólicamente activas, mediante la incorporación metabólica de un residuo ácido ulosónico o ulosonato modificado, tal como KDO, en sus lipopolisacáridos, seguido de la conjugación adicional utilizando reacciones click.

Evidentemente la asimilación de KDO-N₃ puede acoplarse posteriormente a la hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) [24] o cualquier otro procedimiento bien conocido que permita la detección específica de bacterias viables de interés.

El enfoque del ARN ribosómico (ARNr) a la evolución y ecología microbianas se ha convertido en parte integral de la microbiología medioambiental. Basándose en la heterogénea conservación del ARNr, pueden diseñarse sondas oligonucleótidas con especificidades que van desde el nivel específico al nivel de filum o incluso de dominio. Al marcar estas sondas, por ejemplo con pigmentos fluorescentes o el enzima peroxidasa de rábano picante, pueden utilizarse para identificar células microbianas individuales directamente mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) [38]. Se ha propuesto un nuevo enfoque utilizando específicamente un fago [39].

Ejemplo 2: asimilación del ácido 8-O-(4-etinilbencil)-3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO-CCH)

Este compuesto, el ácido 8-O-(4-etinilbencil)-3-desoxi-D-mano-octulosónico o su sal (8-O-(4-etinilbencil)-3-desoxi-D-mano-octulosonato), análogo del compuesto (1a-1), puede prepararse mediante el procedimiento siguiente:

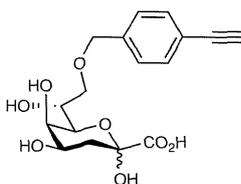


Puede añadirse una solución fría de 5-O-(4-etinilbencil)-D-arabinofuranosa a una solución de ácido oxaloacético en agua, ajustando el pH de la misma a ~10,5 a 11 mediante la adición de NaOH acuoso. Tras agitar a temperatura ambiente, la solución puede neutralizarse y calentarse brevemente a 80°C.

Tras ajustar su pH a ~7 con AcOH, la mezcla puede purificarse mediante cromatografía de intercambio aniónico en resina de formato. Tras la elución inicial con agua, la elución posterior con un gradiente de concentraciones de ácido fórmico, la liofilización, el tratamiento con una resina ácida, la neutralización con amonio y la concentración, puede obtenerse 8-O-(4-etinilbencil)-3-desoxi-D-mano-octulosonato.

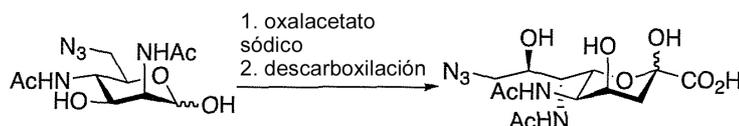
A continuación puede llevarse a cabo la incorporación del compuesto en los LPS bacterianos y el marcaje con una molécula de marcaje derivada de azido, utilizando los mismos reactivos y métodos que para KDO-N₃ (Ejemplo 1).

KDO-CCH (antes de la neutralización con amonio):



Ejemplo 3: asimilación de ácido 9-azido-5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradesoxi-D-glicero-D-talo-no-2-ulosónico y detección específica de bacteria *Legionella*

5 Dicho compuesto, el ácido 9-azido-5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradesoxi-D-glicero-D-talo-no-2-ulosónico o la sal del mismo (9-azido-5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradesoxi-D-glicero-D-talo-no-2-ulosonato), análogo del compuesto (Ib-1), puede prepararse mediante el procedimiento siguiente [52]:

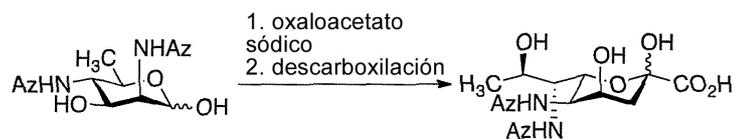


10 Puede añadirse 6-azido-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-manopiranososa a una solución de ácido oxaloacético en agua, ajustando el pH de la misma a ~10,5-11 mediante la adición de NaOH acuoso y agitando la mezcla a temperatura ambiente en presencia o no de tetraborato sódico. Podrían resultar necesarias mayores adiciones de ácido oxaloacético para garantizar una buena conversión. Tras la neutralización con una resina ácida, la filtración y la concentración a un volumen reducido, la solución podría aplicarse en una resina formato, lavarse con agua y eluirse con ácido fórmico. Podría resultar necesaria la purificación adicional, por ejemplo mediante HPLC de fase inversa.

20 A continuación puede llevarse a cabo la incorporación del compuesto en los LPS bacterianos y el marcaje con los mismos grupos reactivos, y los mismos reactivos y métodos que para KDO (Ejemplo 1).

Ejemplo 4: asimilación de ácido 5,7-diazidoacetamido-3,5,7,9-tetradesoxi-D-glicero-D-talo-no-2-ulosónico y detección específica de bacterias de *Legionella*

25 Dicho compuesto, el ácido 5,7-diazidoacetamido-3,5,7,9-tetradesoxi-D-glicero-D-talo-no-2-ulosónico o la sal del mismo (5,7-diazidoacetamido-3,5,7,9-tetradesoxi-D-glicero-D-talo-no-2-ulosonato), análogo del compuesto (Ib-1), puede prepararse tal como en el ejemplo anterior 2, mediante reacción de 2,4-diazidoacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-manopiranososa con ácido oxaloacético.



Az=Azidoacetilo

35 A continuación, puede llevarse a cabo la incorporación del compuesto en los LPS bacterianos y el marcaje de los mismos tal como para KDO.

Ejemplo 5: utilización de diversos medios de cultivo

40 El tipo de medio de cultivo no es limitativo, ya que ambos medios de cultivo de *E. coli*, tanto M9 como LB, han proporcionado un resultado positivo en los ensayos.

1) Materiales y métodos

45 1.1) Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa de tipo salvaje de *E. coli* K12 cultivada en medio M9 (que contenía además ácido casamino 0,2%, glucosa 0,2%, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 5 mM) o en medio de Luria-Bertani (LB) [54]. Las células se cultivaron en un agitador giratorio (200 rpm) a 37°C.

50

1.2) Reacciones click catalizadas por cobre

Se diluyeron cultivos de durante la noche 100 veces en medio fresco (volumen final: 200 µl) que contenía KDO-N₃ (1 mM). Las bacterias se incubaron a 37°C durante 12 horas y después se lavaron 3 veces con tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5) mediante centrifugación a 14.000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Una premezcla click compuesta de CuSO₄ y TGTA, a concentraciones finales de 2 mM y 4 mM, respectivamente, se incubó durante la noche en un tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5) a 37°C bajo agitación vigorosa. A continuación, se añadió aminoguanidina, ascorbato sódico y A488-ino a concentraciones finales de 4 mM, 5 mM y 0,13 mM, respectivamente, a la premezcla click de durante la noche. A continuación se resuspendieron las bacterias en dicha solución y se incubaron durante 30 minutos a 37°C bajo agitación. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con tampón de fosfato mediante centrifugación a 14.000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente.

1.3) Microscopía de fluorescencia

El análisis de microscopía se llevó a cabo tras reacción click con cobre en un inóculo bacteriano depositado sobre cubreobjetos de vidrio y cubierto con una almohadilla delgada (1 mm de grosor) semisólida de agar al 1% con LB diluido (1/10 en tampón de fosfato). Se registraron imágenes con un microscopio de epifluorescencia automatizado (Nikon TE2000-E-PFS, Nikon, Francia) dotado de una cámara CoolSNAP HQ 2 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, Francia) y un objetivo 100x/1,4 DLL. Se emitió luz de excitación con una luz de haluro metálico de 120 W y se realizó un seguimiento de la señal utilizando filtros apropiados. Se llevó a cabo el análisis digital y el procesamiento de las imágenes con una secuencia de comandos de automatización (Visual Basic) en Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Molecular Devices France, Francia).

2) Resultados

Se produjo la asimilación del KDO en todos los medios de cultivo.

Se llevó a cabo el análisis en 616 células *E. coli* de medio LB y 598 células *E. coli* de medio mínimo (M9).

Se observó una asimilación de KDO más alta al cultivar las células en medio LB que en medio M9. Sin embargo, ambos medios son convenientes y resultan suficientes para detectar y cuantificar las bacterias cultivables.

Ejemplo 6: detección y recuento de células cultivables/vivas y muertas de *E. coli*.

Se pusieron en contacto con KDO-N₃ un número conocido de ambas *E. coli* cultivables capaces de multiplicarse y *E. coli* muertas. Se incorporó KDO-N₃ únicamente en las *E. coli* vivas. Se incorporó KDO-N₃ en la totalidad de las *E. coli* vivas.

1) Materiales y métodos

1.1) Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se cultivó *E. coli* K12 en medio de Luria-Bertani (LB) en un agitador giratorio (200 rpm) a 37°C. Se obtuvieron *E. coli* K12 muertas tras calentar a 120°C durante 15 minutos.

1.2) Reacciones click catalizadas por cobre (tal como se da a conocer en el Ejemplo 5).

1.3) Recuento bacteriano y microscopía de fluorescencia.

1.3.1) Para el recuento de bacterias totales, las células se fijaron y se tiñeron en una solución de paraformaldehído al 3%-DAPI 2 µg/ml y se filtraron por una membrana de policarbonato Isopore (Millipore).

1.3.2) También se realizó un seguimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante la siembra en placa de diluciones antes de las reacciones click catalizadas por cobre.

1.3.3) Se llevaron a cabo análisis de microscopía tras la reacción click de cobre en inóculos bacterianos aplicados sobre cubreobjetos de vidrio y se cubiertos con una almohadilla delgada (1 mm de grosor) semisólida de agar al 1% preparada con LB diluido (1/10 en tampón de fosfato). Se registraron las imágenes con un microscopio de epifluorescencia automatizado (Nikon TE2000-E-PFS, Nikon, Francia) dotado de una cámara Cool SNAP HQ 2 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, Francia) y un objetivo 100x/1.4 DLL. Se emitió luz de excitación con una luz de haluro metálico de 120 W y se realizó un seguimiento de la señal utilizando filtros apropiados. Se llevó a cabo el análisis digital y el procesamiento de las imágenes con una secuencia de comandos de automatización (Visual Basic) en Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Molecular Devices France, Francia).

2) Resultados

2.1) La densidad celular total calculada a partir del recuento total dado a conocer en 1.3.1) fue de 9×10^9 +/- $0,1 \times 10^9$ células/ml, mientras que la densidad de células cultivables contada a partir del recuento de colonias dado a conocer en 1.3.2) fue de 4×10^9 +/- $0,15 \times 10^9$ UFC/ml. Estos resultados indican que el 44,5% (+/- 4%) de todas las células presentes en dicha muestra era cultivable.

2.2) El recuento mediante fluorescencia tras las reacciones click tal como se da a conocer en los párrafos 1.2/1.3.3 proporcionó los resultados siguientes. Una muestra se incubó sin KDO-N₃ y una muestra se incubó con KDO-N₃. El análisis de fluorescencia se llevó a cabo en 1.878 células *E. coli* con KDO-N₃ y 3.039 células de *E. coli* sin KDO-N₃. Permitted determinar un umbral de unidades arbitrarias de fluorescencia de 30, bajo el cual las células estaban muertas y sobre el cual las células eran cultivables. A continuación, aplicando dicho umbral (30) resultó posible contar las células identificadas como muertas (inferior a 30) y las identificadas como cultivables (superior a 30) en bacterias que habían reaccionado en las reacciones click tal como en 1.3.3). Mediante esta evaluación se encontraron 1.587 células muertas (KDO-N₃) y 1.452 células cultivables (KDO-N₃⁺), conduciendo a un 47,7% de células cultivables. Este valor aparentemente es estadísticamente idéntico al obtenido utilizando células muertas y cultivables (44,5%), demostrando que sólo las células cultivables son detectadas mediante el método de la presente invención.

Ejemplo 7: detección de sólo células cultivables Gram-

Se puso en contacto con KDO-N₃ una mezcla de bacterias Gram+ (*B. subtilis*) y bacterias Gram- (*E. coli*). Sólo se marcaron las bacterias Gram- con KDO-N₃ y se detectaron.

1) Materiales y métodos

1.1) Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se cultivaron en medio de Luria-Bertani (LB) en un agitador giratorio (200 rpm) a 37°C bacterias *E. coli* K12 cepa de tipo salvaje que habían sido convertidas en fluorescentes mediante mCherry [55], *E. coli* K12 sodA-mCherry [55], y *B. subtilis*.

1.2) Reacciones click catalizadas por cobre (tal como se da a conocer en el Ejemplo 6)

1.3) Recuento bacteriano y microscopía de fluorescencia (tal como se da a conocer en el Ejemplo 5)

2) Resultados

Se cultivaron *B. subtilis* y *E. coli* en medio LB durante 12 horas. Después de este tiempo, se identificó la densidad de células cultivables de *E. coli* ($1,66 \times 10^9$ UFC/ml) y de *B. subtilis* ($5,9 \times 10^8$ UFC/ml) mediante el recuento dado a conocer en el párrafo 1.32), indicando que el 26% de las células cultivables eran *B. subtilis* y el 74% eran *E. coli*.

Además, debido a que se utilizó la cepa *E. coli* sodA-mCherry, resultó posible diferenciar entre *E. coli* y *B. subtilis* utilizando la fluorescencia tal como se ha dado a conocer anteriormente, aunque antes de la reacción click. De las 696 células analizadas, 170 eran negativas para mCherry (24,4%), representando en consecuencia *B. subtilis*, mientras que 526 eran positivas para mCherry (75,6%), representando en consecuencia *E. coli*. Estos resultados son corroborados por los porcentajes obtenidos de los valores de UFC.

A continuación, todas las bacterias de la misma muestra fueron sometidas a la reacción click anteriormente indicada y los resultados de recuentos mediante fluorescencia se proporcionan en la Tabla 1, posteriormente.

De entre las células negativas para KDO-N₃, se evaluó el número de células negativas para mCherry, que representan en consecuencia *B. subtilis* (166), y el número de células positivas para mCherry, que representan en consecuencia células de *E. coli* (9). De entre las células positivas para KDO-N₃, se evaluó el número de células negativas para mCherry, que representan en consecuencia el número de *B. subtilis* (4), y el número de células positivas para mCherry, que representan en consecuencia el número de células de *E. coli* cultivable (517).

Utilizando la totalidad de dichos valores resultó posible identificar 4 *B. subtilis* como falsos positivos (aproximadamente 2%). En contraste, las 9 células de *E. coli* negativas para KDO (aproximadamente 2%) podrían ser falsos positivos o falsos negativos, ya que el intervalo de error estándar del método es de aproximadamente 10%.

	KDO-N ₃ ⁺	KDO-N ₃ ⁻	Total
mCherry ⁺ (<i>E. coli</i>)	517	9	526
mCherry ⁻ (<i>B. subtilis</i>)	4	166	170
Total	521	175	696

Por lo tanto, dichos resultados demuestran que KDO-N₃ ha sido bien asimilado en sustancialmente sólo las células de *E. coli* cultivables y no en las células de *B. subtilis* cultivables.

5 Ejemplo 8: detección mediante biotina-alquino

Tras la asimilación de KDO-N₃, se llevó a cabo una reacción click utilizando biotina-alquino y se detectaron las células de *E. coli* viables utilizando un anticuerpo anti-biotina acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor A494. Tal como se observó mediante la comparación del recuento de cultivables y el recuento de células positivas para KDO, todas las bacterias de *E. coli* viables fueron detectadas mediante el procedimiento experimental siguiente.

1) Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se cultivaron *E. coli* K12 de cepa de tipo salvaje en medio de Luria-Bertani (LB) en un agitador giratorio (200 rpm) a 37°C.

2) Reacción click catalizada por cobre

Se diluyeron cultivos de durante la noche 100 veces en medio fresco (volumen final: 200 µl) que contenía KDO-N₃ (1 mM). Se incubaron las bacterias a 37°C durante 12 horas, se lavaron 3 veces con tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5) mediante centrifugación a 14.000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente. Una premezcla click compuesta de CuSO₄ y TGTA a concentraciones finales de 2 mM y 4 mM, respectivamente, se incubó durante la noche en tampón de fosfato a 37°C bajo agitación vigorosa. A continuación, se añadió aminoguanidina, ascorbato sódico a concentraciones finales de 4 mM y 5 mM, respectivamente, a la premezcla click de durante la noche. Esta "mezcla click" se añadió al cultivo lavado y se complementó o no con biotina-alquino (Carbosynth) (1 a 100 µg) y se incubó durante 1 a 60 minutos a 37°C bajo agitación.

3) Recuento de bacterias y microscopía de fluorescencia

Para el recuento de bacterias totales tanto antes como después de las reacciones click con cobre, se fijaron las células y se tiñeron en una solución de paraformaldehído al 3%-DAPI 2 µg/ml y se filtraron por una membrana de policarbonato Isopore (Millipore).

Se utilizó un anticuerpo anti-biotina acoplado con Alexa Fluor A594 (Jackson ImmunoResearch) diluido 10 a 1.000 veces para marcar las bacterias. También se realizó un seguimiento de las unidades formadoras de colonia (UFC) mediante la siembra en placa de diluciones antes de la reacción click con cobre.

Se llevaron a cabo análisis de microscopía tras la reacción click con cobre de inóculos bacterianos depositados sobre cubreobjetos de vidrio y cubiertos con una almohadilla delgada (1 mm de grosor) semisólida de agar al 1% preparada con LB diluido (1/10 en tampón de fosfato). Se registraron imágenes con un microscopio de epifluorescencia automatizado (Nikon TE2000-E-PFS, Nikon, Francia) dotado de una cámara CoolSNAP HQ 2 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, Francia) y un objetivo 100x/1,4 DLL. Se emitió luz de excitación con una luz de haluro metálico de 120 W y se realizó un seguimiento de la señal utilizando filtros apropiados. Se llevó a cabo el análisis digital y el procesamiento de las imágenes con una secuencia de comandos de automatización (Visual Basic) en Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Molecular Devices France, Francia).

Referencias

[1] E. Sletten, C. R. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 2011, en prensa, DOI: 10.1021/ar200148z; M. Boyce, C. R. Bertozzi, Nature methods 2011, 8, 638-642; D. H. Dube, K. Champana, B. Wang, Chem. Commun. 2011, 47, 87-101; S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 2009, 106, 12-17; J. Du, M. A. Meledeo, Z. Wang, H. S. Khanna, V. D. P. Paruchuri, K. J. Yarema, Glycobiology 2009, 19, 1382-1401; S. R. Hanson, W. A. Greensberg, C.-H. Wong, QSAR Comb. Sci. 2007, 26, 1243-1253.

[2] L. Yang, J. O. Nyalwidhe, S. Guo, R. R. Drake, O. J. Semmes, Mol. Cell. Proteomics 2011, 10, M110.007294.

[3] Para una aplicación a los glicanos de las levaduras ver: M. A. Breidenbach, J. E. G. Gallagher, D. S. King, B. P. Smart, P. Wu, C. R. Bertozzi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107, 3988-3993.

[4] W. Yi, X. Liu, Y. Li, J. Li, C. Xia, G. Zhou, W. Zhang, W. Zhao, X. Chen, P. G. Wang, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 106, 4207-4212.

[5] Ver, por ejemplo: G. Samuel, J.-P. Hogbin, L. Wang, P. R. Reeves, J. Bacteriol. 2004, 186, 6536-6543; B. Ma, J. L. Simala-Grant, D. E. Taylor, Glycobiology 2006, 16, 158R-184R.

[6] La L-fucosa exógena de hecho es metabolizada en L-lactato o en L-1,2-propanodiol, que potencialmente podrían

- demostrar ser una fuente de diseminación del informador químico en diversos metabolitos. Ver: L. Baldoma, J. Aguilar, J. Bacteriol. 1988, 170, 416-421
- 5 [7] L. Cipolla, L. Gabrielli, D. Bini, L. Russo, N. Shaikh, Nat. Prod. Rep., 2010, 27, 1618-1629.
- [8] Sin embargo, recientemente se ha descrito una cepa viable de *E. coli* que carece de KDO. Ver: T. C. Meredith, P. Aggawal, U. Mamat, B. Lindner, R. W. Woodward, ACS Chem. Biol. 2006, 1, 33-42.
- 10 [9] O. Holst, FEMS Microbiol. Lett. 2007, 271, 3-11.
- [10] L. Cipolla, A. Polissi, C. Airoidi, P. Galliani, P. Sperandeo, F. Nicotra, Curr. Drug. Discov. Technol. 2009, 6, 19-33.
- 15 [11] J. O. Capobianco, R. P. Darveau, R. C. Goldman, P. A. Lartey, A. G. Pernet, J. Bacteriol. 1987, 169, 4030-4035.
- [12] C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, J. Org. Chem. 2002, 67, 3057-3064; V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 2596-2599.
- 20 [13] Para una revisión ver: A. Banaszek, J. Mlynarski in Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 30 (Ed.: Atta-ur-Rahman), Elsevier, Amsterdam, 2005, pp. 419-482.
- [14] Durante el curso del presente trabajo se ha publicado un acceso muy similar a 8-azido-8-desoxi-KDO: R. Winzar, J. Philips, M. J. Kiefel, Synlett 2010, 583-586.
- 25 [15] M. A. Ghalambor, E. C. Heath, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1963, 11, 288-293.
- [16] I. A. Smellie, S. Bhakta, E. Sim, A. J. Fairbanks, Org. Biomol. Chem. 2007 5, 2257-2266.
- [17] S. Müller-Loennies, B. Lindner, H. Brade. J. Biol. Chem., 2003, 278, 34090-34101.
- 30 [18] V. Hong, N. S. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, Bioconj. Chem. 2010, 21, 1912-1916.
- [19] A. Baron, Y. Blériot, M. Sollogoub, B. Vauzeilles, Org. Biomol. Chem. 2008, 6, 1898-1901.
- 35 [20] J. A. May, A. C. Sartorelli, J. Med. Chem. 1979, 22, 971-976.
- [21] E. Vinogradov, A. Korenevsky, T. J. Beveridge, Carbohydr. Res. 2003, 338, 1991-1997; S. Leone, A. Molinaro, C. De Castro, A. Baier, E. L. Nazarenko, R. Lanzetta, M. Parrilli, J. Nat. Prod. 2007, 70, 1624-1627.
- 40 [22] D. C. Ellwood, J. Gen. Microbiol. 1970, 60, 373-380.
- [23] B. L. Ridley, B. S. Jeyaretnam, R. W. Carlson, Glycobiology 2000, 10, 1013-1023.
- 45 [24] M. Wagner, P. H. Nielsen, A. Loy, J. L. Nielsen, H. Daims, Curr. Opin. Biotechnol. 2006, 17, 83-91.
- [25] Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, P.A., Russek-Cohen, E. y Colwell, R.R. (1994) Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3573-3578.
- 50 [26] Nwoguh, C.E., Harwood, C.R. y Barer, M.R. (1995) Detection of induced L-galactosidase activity in individual nonculturable cells of pathogenic bacteria by quantitative cytological assay. Mol. Biol. 17, 545-554.
- [27] Kogure, K., Simidu, U. y Taga, N. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can. J. Microbiol. 25, 415-420.
- 55 [28] Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. y Ridgeway, H.F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1801-1808.
- [29] Thom, S.M., Horobin, R.W., Seidler, E. y Barer, M.R. (1993) Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. J. Appl. Bacteriol. 74, 433-443.
- 60 [30] Ullrich, S., Karrasch, B., Hoppe, H.-G., Jeskulke, K. y Mehrens, M. (1996) Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-dityl tetrazolium chloride. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4587-4593.
- 65 [31] Korgaonkar, K.S. y Ranade, S.S. (1966) Evaluation of acridine orange fluorescence test in viability studies of *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 12, 185-190.

- [32] Porter, K.G. y Feig, Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948.
- 5 [33] Davey, H.M. y Kell, D.B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* 60, 641-696.
- [34] Parthuisot, N., Catala P., Lemarchand, K., Baudart, J., y Lebaron, P. (2000) Evaluation of ChemChrome V6 for bacterial viability assessment in waters. *J. Appl Microbiol.* 89, 370-380.
- 10 [35] Breeuwer, P., y Abee, T. (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 10, 193-200.
- [36] Berney, M., Vital, M., Hulshoff, I., Weilenmann, HU, Egli, T., y Hammes, F. (2008) Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. *Water Res.* 42, 4010-4018.
- 15 [37] Rijpens, NP, y Herman, LM. (2002) *J AOAC Int*, 85, 984-995.
- [40] Cuny, C., Lesbats, M., y Dukan, S. (2007) Induction of a global stress response during the first step of *Escherichia coli* plate growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 885-889.
- 20 [38] Amman, R. y Fuchs, B.M. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques (2008) *Nature Reviews Microbiology*, 6, 339-348.
- [39] Wu, L, Huang, T., Yang L.; Pan, J., Zhu, S., y Yan X. (2011) Sensitive and selective bacterial detection using tetracycline-tagged phages in conjunction with biarsenical dye. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50, 5873-5877.
- 25 [41] Mackey, B. M., y Seymour, D. A. (1987) The effect of catalase on recovery of heat-injured DNA-repair mutants of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1601-1610.
- [42] Marthi, B., Shaffer, B. T., Lighthart, B., y Ganio, L. (1991) Resuscitation effects of catalase on airborne bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2775-2776.
- 30 [43] McDonald, L. C., Hackney, C. R. y Ray, B. (1983) Enhanced recovery of injured *Escherichia coli* by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 360-365.
- 35 [44] Dukan, S., Belkin, S. y Touati D. (1999) Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 311-316.
- [45] Dukan, S., y Nystrom, T. (1999) Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 274, 26027-26032.
- 40 [46] Ohtomo, R., y Saito, M. (2001) Increase in the culturable cell number of *Escherichia coli* during recovery from saline stress: possible implication for resuscitation from the VBNC state. *Microb. Ecol.* 42, 208-214.
- [47] Ray, B., Jezeski, J.J., y Busta, F.F. (1971) Effect of rehydration on recovery, repair, and growth of injured freeze-dried *Salmonella anatum*. *Appl. Microbiol.* 22, 184-189.
- 45 [48] Speck, M. L., Ray, B., y Read, R. B. Jr. (1975) Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure. *Appl. Microbiol.* 29, 549-550.
- 50 [49] Bogosian, G., y Bourneuf E.V. (2001) A matter of bacterial life and death. *EMBO Rep.* 2:770-774.
- [50] 1. A. Smellie, S. Bhakta, E. Sim, A. J. Fairbanks, *Org. Biomol. Chem.* 2007 5, 2257-2266.
- 55 [51] A. Ducret, E. Maisonneuve, P. Notareschi, A. Grossi, T. Mignot, S. Dukan, *PLoS One*, 2009, 4, e7282.
- [52] Y. E. Tsvetkov, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, U. Zähringer, *Carbohydr. Res.* 2001, 335, 221-243.
- [53] Valentin O. Rodionov, Stanislav I. Presolski, Sean Gardinier, Yeon-Hee Lim, y M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 12696-12704.
- 60 [54] Bachmann BJ (1987) Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M& Umberger HE, eds), pp. 1190-1219. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 65

[55] A. Ducret, E. Maisonneuve, P. Notareschi, A. Grossi, T. Mignot y S. Dukan (2009) A microscope automated fluidic system to study bacterial processes in real time. PLoS One. 2009 Sep 30;4(9):e7282.

REIVINDICACIONES

1. Método para marcar específicamente bacterias vivas de una categoría dada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, comprendiendo el método las etapas de:

a) incubar dichas bacterias de dicha muestra con por lo menos un análogo de un compuesto monosacárido, siendo dicho monosacárido un residuo monosacárido endógeno de glicanos de la membrana externa de dicha categoría dada de bacterias, comprendiendo dicho residuo monosacárido endógeno un residuo ácido ulosónico o sal ulosonato, siendo dicho análogo de un compuesto monosacárido un monosacárido modificado sustituido en una posición dada con un primer grupo químico reactivo que puede reaccionar con un segundo grupo reactivo de una molécula de marcaje, siendo dicha posición dada preferentemente una posición que comprende un grupo libre en dicho residuo monosacárido endógeno incorporado dentro de dichos glicanos de la membrana externa de las bacterias,

b) poner en contacto dichas bacterias con dicha molécula de marcaje que comprende dicho segundo grupo reactivo, para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo análogo incorporado dentro de dichos glicanos de la membrana externa de dichas bacterias vivas con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula de marcaje.

2. Método según la reivindicación 1 para marcar específicamente bacterias que pueden multiplicarse, en el que dichas bacterias se incuban en un medio de cultivo en o sobre el cual, dichas bacterias pueden multiplicarse.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, que comprende la etapa adicional de:

c) detectar unas bacterias vivas al detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula de marcaje unida a los glicanos de su membrana externa y/o inmovilizar dichas bacterias vivas portadoras de dicha molécula de marcaje sobre un sustrato sólido.

4. Método según la reivindicación 3, en el que dicha molécula de marcaje es una molécula detectable que comprende una sustancia detectable o que puede reaccionar o estar unida a una sustancia detectable o dicha molécula de marcaje es una primera molécula portadora de dicho segundo grupo reactivo, pudiendo dicha primera molécula reaccionar o estar unida a una segunda molécula y/o a un sustrato sólido, comprendiendo preferentemente dicha segunda molécula una sustancia detectable y/o estando unida dicha segunda molécula a dicho sustrato sólido.

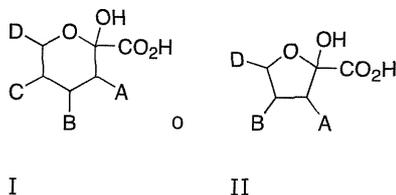
5. Método según la reivindicación 4, para detectar específicamente las bacterias vivas de una categoría dada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, en el que dicha molécula de marcaje es una molécula detectable que comprende una sustancia detectable, comprendiendo el método la etapa c) de detectar bacterias vivas al detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula detectable unida a los glicanos de su membrana externa.

6. Método según la reivindicación 4, en el que dicha molécula de marcaje es un primer ligando o una primera proteína de unión portador/a de dicho segundo grupo reactivo y en el que en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas con dicho/a primer ligando o primera proteína de unión se detectan y/o se inmovilizan mediante la puesta en contacto de dicho/a primer ligando o primera proteína de unión con un segundo ligando o una segunda proteína de unión que reacciona o se une específicamente a dicho/a primer ligando o primera proteína de unión.

7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha molécula de marcaje es un primer ligando, preferentemente biotina, portador de dicho segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas con dicho primer ligando son detectadas mediante la reacción de dichas bacterias con un anticuerpo específico para dicho primer ligando, portando dicho anticuerpo una sustancia detectable, preferentemente un fluorocromo o una molécula luminiscente o un enzima.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que dicha sustancia detectable es un fluorocromo o una molécula luminiscente detectable mediante fluorescencia o luminiscencia.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho análogo de compuesto monosacárido es un ácido ulosónico que presenta una de las fórmulas (I) o (II) siguientes, o una sal ulosonato del mismo:



en el que:

- 5 - A, B y C pueden ser independientemente H, OH, NH₂, OH y NH₂, estando sustituidos o no con grupos protectores de los mismos, preferentemente sustituidos con grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y
- 10 - D es una cadena alquilo en C₂ a C₄, estando cada carbono sustituido o no con OH o NH₂ sustituido o no con grupos protectores de los mismos, preferentemente con grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y
- por lo menos uno de los grupos A, B, C o D se sustituye con dicho primer grupo reactivo.

15 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho análogo de monosacárido es un compuesto ácido octulosónico o sal octulosonato sustituido o un compuesto ácido nonulosónico o sal nonulosonato sustituido.

20 11. Método según la reivindicación 10 para detectar específicamente bacterias Gram-negativas vivas, en el que dicha categoría dada de bacterias es la categoría de las bacterias Gram-negativas y dicho residuo monosacárido endógeno de dicha capa de LPS de la membrana externa de las bacterias es un residuo ácido desoxioctulosónico o desoxioctulosonato, y dicho análogo de compuesto monosacárido es un compuesto ácido desoxioctulosónico o desoxioctulosonato sustituido.

25 12. Método según la reivindicación 11, en el que dicho análogo de compuesto ácido desoxioctulosónico o desoxioctulosonato se sustituye con dicho grupo reactivo en una posición seleccionada de entre las posiciones 3, 4, 5, 7 y 8 del monosacárido, preferentemente 3, 7 y 8.

30 13. Método según las reivindicaciones 9 a 12, en el que dicho análogo de compuesto ácido desoxioctulosónico o desoxioctulosonato de fórmula (I) o (II) se sustituye con dicho primer grupo reactivo R₁ en la posición 8, en el que D=-CHOH-CH₂-R₁, A=H, B=OH, C=OH en la fórmula (I) o D=-CHOH-CHOH-CH₂-R₁, A=H, B=OH en la fórmula (II).

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dichas bacterias Gram-negativas comprenden *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila* y *Pseudomonas aeruginosa*.

35 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para marcar específicamente bacterias *Legionella pneumophila* vivas y dicha categoría dada de bacterias es la categoría de las bacterias *Legionella pneumophila* y dicho residuo monosacárido endógeno de dicha capa de LPS de la membrana externa de las bacterias es un ácido 4-epilegionamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-D-glicero-D-talo-no-2-ulosónico) o un residuo 4-epilegionaminato, o un residuo ácido legionamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-D-glicero-D-galacto-no-2-ulosónico) o legionaminato, y dicho análogo de un compuesto monosacárido es, respectivamente, un compuesto ácido 4-epilegionamínico o 4-epilegionaminato sustituido, o un compuesto ácido legionamínico o legionaminato sustituido, preferentemente sustituido en una posición seleccionada de entre las posiciones 3, 4, 5, 7, 8 y 9 del ciclo monosacárido, preferentemente 5, 7 y 9.

45 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para marcar, preferentemente detectar, específicamente bacterias *Pseudomonas aeruginosa* vivas y dicha categoría dada de bacterias es la categoría de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y dicho residuo monosacárido endógeno de dicha capa de LPS de la membrana externa de las bacterias es un residuo ácido 8-epilegionamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-D-glicero-D-galacto-no-2-ulosónico) u 8-epilegionaminato, o un residuo ácido pseudamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeso-D-glicero-L-mano-no-2-ulosónico) o pseudaminato, y dicho análogo de un compuesto monosacárido es, respectivamente, un compuesto ácido 8-epilegionamínico u 8-epilegionaminato sustituido, o un compuesto ácido pseudamínico o pseudaminato sustituido, preferentemente sustituido en una posición seleccionada de entre las posiciones 3, 4, 5, 7, 8 y 9 del anillo monosacárido, preferentemente 5, 7 y 9.

55 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicho primer grupo reactivo se selecciona de entre grupos que consisten en o portan el grupo azido y grupos que consisten en o portan el grupo alquino, y dicho segundo grupo reactivo se selecciona de entre grupos que consisten en o portan, respectivamente, los grupos alquino y azido, y la reacción de dicho grupo reactivo azido con dicho grupo reactivo alquino se lleva a cabo al realizar una cicloadición de azida-alquino.

60 18. Método según la reivindicación 17, en el que la reacción se lleva a cabo en condiciones catalizadas por cobre en presencia de un ligando tris-triazolilo, preferentemente TGTA.

65 19. Método según las reivindicaciones 2 y 4 y cualquiera de las reivindicaciones 8 a 18 para el recuento de bacterias vivas, en el que dicha incubación de la etapa a) y la reacción de la etapa b) se llevan a cabo sobre un sustrato sólido, preferentemente un filtro de membrana de manera que las bacterias cultivadas que provienen de una misma

bacteria original que se ha multiplicado se agrupan conjuntamente y pueden visualizarse con un microscopio y dicha molécula detectable puede detectarse mediante visualización con dicho microscopio.

20. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que comprende:

- 5
- dicho análogo de un compuesto monosacárido que comprende un compuesto ácido ulosónico o ulosonato sustituido en una posición dada con dicho primer grupo químico reactivo, y
 - dicha molécula de marcaje que comprende dicho segundo grupo reactivo que puede reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y
 - unos reactantes para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo análogo incorporado dentro de dichos glicanos de la membrana externa de dichas bacterias con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula de marcaje, y
 - un medio de cultivo o incubación que permite el crecimiento de dicha categoría dada de bacterias, preferentemente específico para el crecimiento de dicha categoría dada de bacterias.
- 10
- 15

21. Kit según la reivindicación 20, para llevar a cabo el método según la reivindicación 19, que comprende además:

- 20
- dicha molécula detectable que comprende dicho segundo grupo reactivo que puede reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y
 - un medio sólido que permite la visualización de las bacterias tras la incubación con dicho análogo de un compuesto monosacárido, dichos reactantes y dicha molécula detectable.
- 25

22. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, que comprende:

- 30
- dicho análogo de un compuesto monosacárido que es un compuesto ácido desoxioctulosónico o sal desoxioctulosonato sustituido con dicho primer grupo reactivo que comprende un grupo azido o alquino, y
 - dicho segundo grupo reactivo de la molécula detectable que porta un alquino o, respectivamente, un grupo azido, y
 - dichos reactantes que comprenden un catalizador de cobre y un ligando tris-triazolilo.
- 35

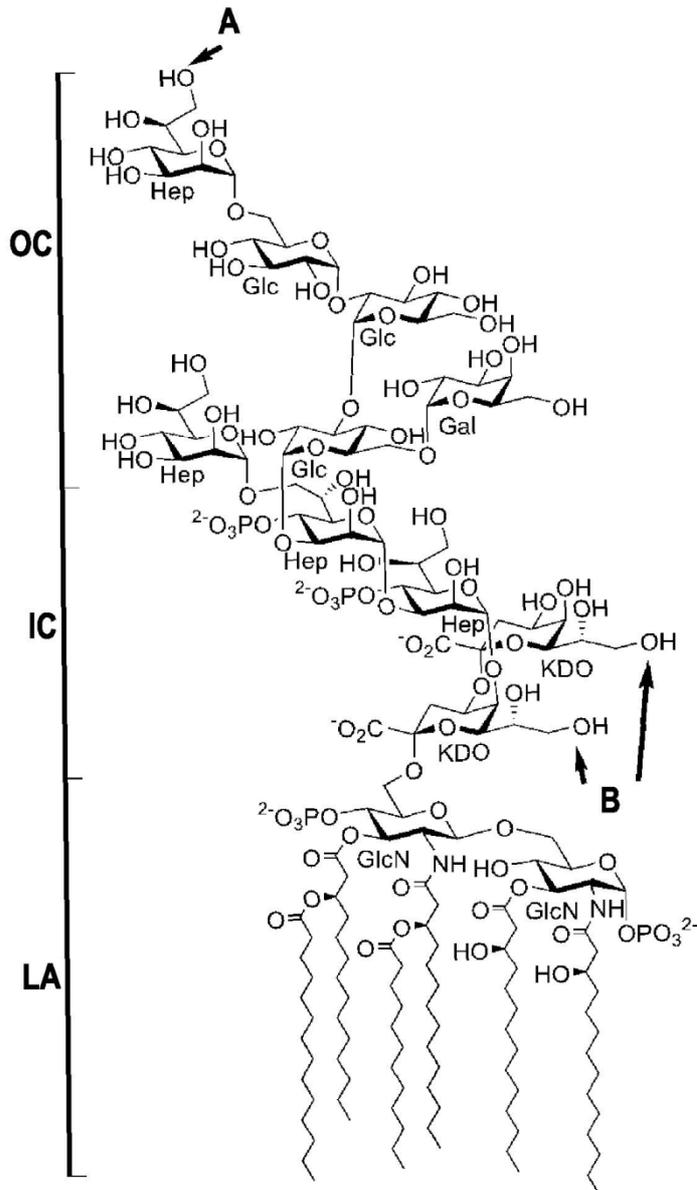


FIG.1A

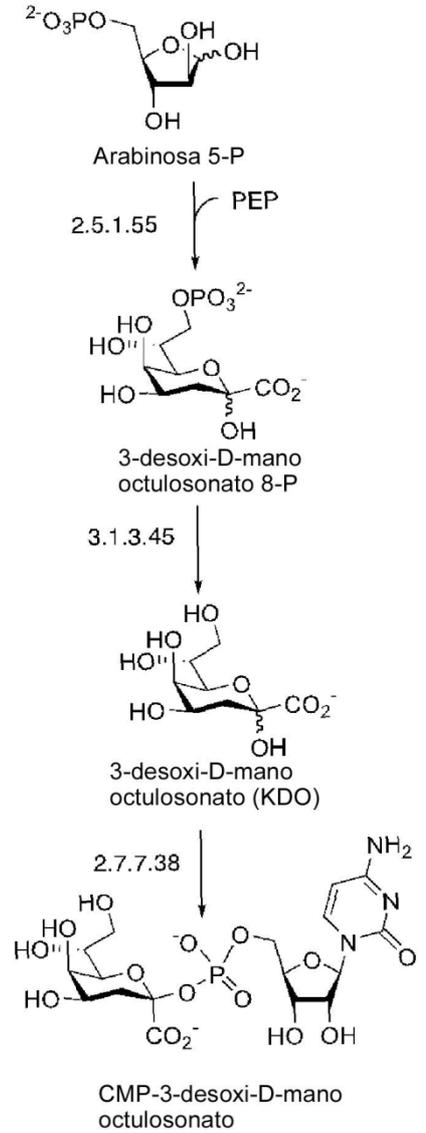


FIG.1B

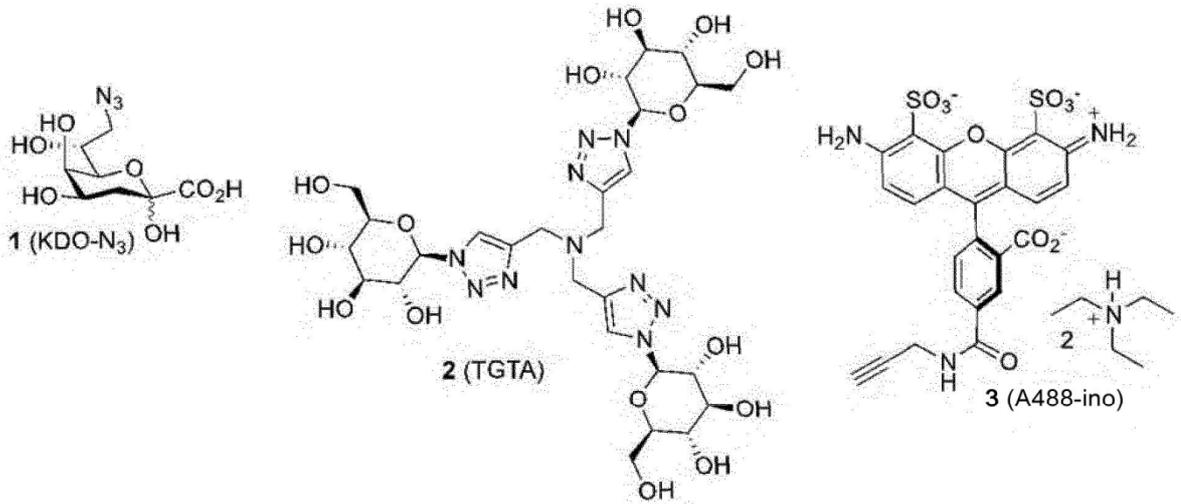


FIG.2A

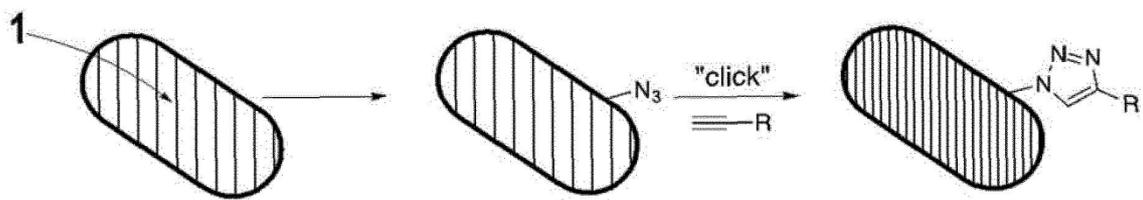


FIG.2B

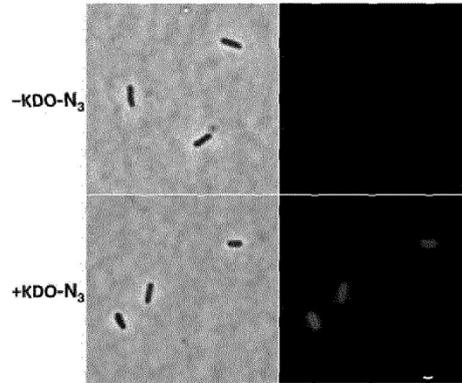


FIG.3A

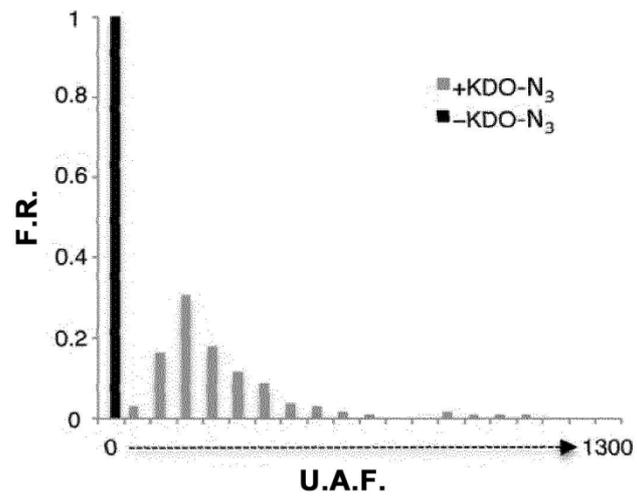


FIG.3B



FIG.3C

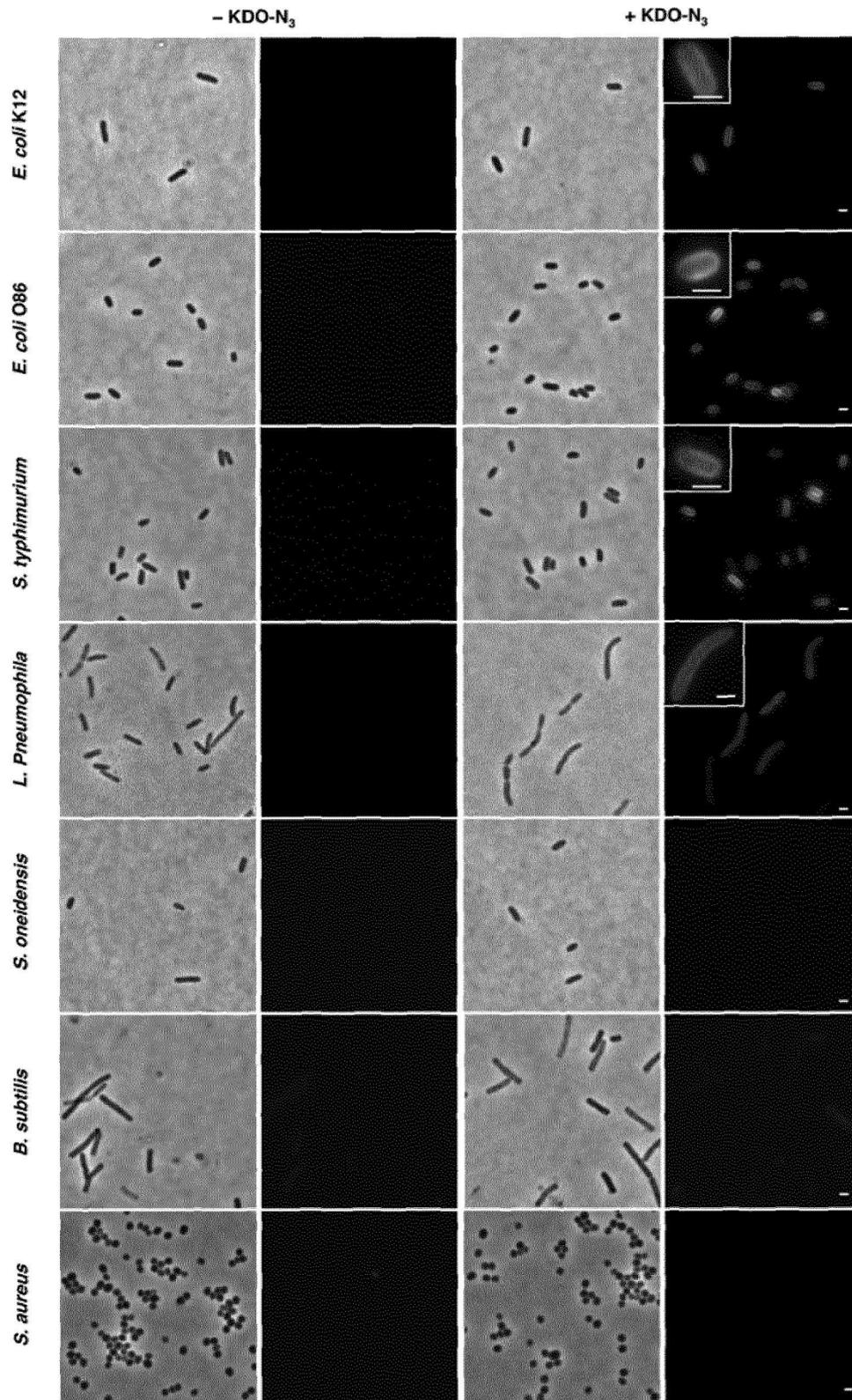


FIG.4

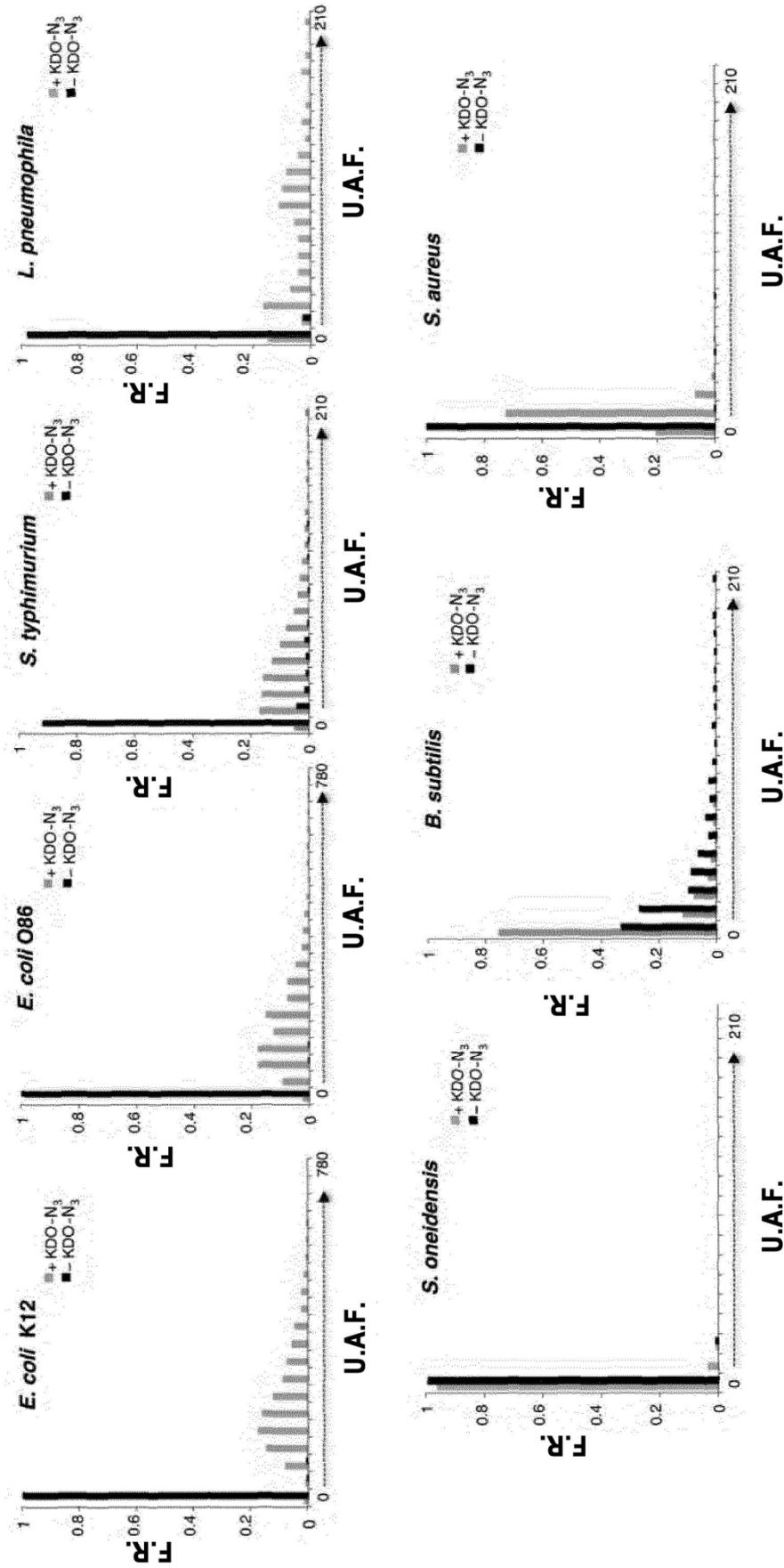


FIG.5