

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 061**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/IB2011/055384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12073202**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11797269 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2646565**

54 Título: **Procedimiento de detección y cuantificación de microorganismos**

30 Prioridad:

01.12.2010 FR 1059983

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2017

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (33.3%)
25, Rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D"
75015 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ROUPIOZ, YOANN;
CALEMCZUK, ROBERTO;
VERNET, THIERRY;
LIVACHE, THIERRY;
BOUGUELIA, SIHEM y
DURMORT, CLAIRE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 644 061 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección y cuantificación de microorganismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección y cuantificación de microorganismos en una muestra.

10 Antecedentes de la invención

La detección de microorganismos vivos en ciertas muestras es de una importancia crucial, particularmente en el campo médico y en la industria agroalimentaria.

15 El método de detección estándar sigue siendo el cultivo microbiano, que a menudo requiere varios días para la obtención de un número suficiente de microorganismos para identificar el germen buscado. En el caso de una búsqueda a partir de una muestra obtenida de un paciente, esta demora antes de la obtención de resultados, implica a menudo una administración preventiva al paciente de antibióticos de amplio espectro. Para las bacterias patógenas, el aumento del número de cepas resistentes a los antibióticos es, por lo tanto, una posible consecuencia de este protocolo de medicación que no está dirigido a una bacteria particular sino a muchas otras especies bacterianas.

El diagnóstico bacteriológico se realiza convencionalmente en dos tiempos:

- 25 - una primera fase de crecimiento, generalmente en medio sólido, de bacterias para tener un número suficiente de ellas y aislar la bacteria sospechosa; en esta fase, el estudio en medio de cultivo sólido, de la forma de las colonias permite una identificación preliminar de las bacterias; además esta fase está frecuentemente acoplada a una detección no específica de las bacterias, por cultivo en medio líquido basado en la acidificación del medio de cultivo o variaciones de las propiedades ópticas del medio, por ejemplo por difusión de la luz, lo que da una idea
- 30 de la eventual presencia de bacterias en la muestra;
- una segunda fase de identificación de la bacteria por crecimiento en medio selectivo, a continuación de estudio de los caracteres bioquímicos e inmunológicos, siguiendo una clave dicotómica, que va de los caracteres más amplios a los más precisos, para llegar a una especie bacteriana particular.

35 En las aplicaciones médicas, una etapa suplementaria antes del tratamiento terapéutico es, a menudo, necesaria, ésta consiste en realizar un antibiograma para ensayar el nivel de resistencia de la bacteria frente a diferentes antibióticos de la farmacopea.

40 Este método necesita al menos 24 h de crecimiento y, para ciertas especies bacterianas, hasta varios días de cultivo antes de la identificación visual. En todos los casos, el periodo de análisis es crucial, y las etapas de enriquecimiento y a continuación de análisis son muy largas (de uno a varios días).

45 A fin de reducir este plazo, se han desarrollado métodos más rápidos de detección *in vitro* del crecimiento bacteriano. Sin embargo, todos estos enfoques se basan en sistemas multietapa que implican, en primer lugar, una fase de cultivo para aumentar el número de bacterias presentes en la muestra, y a continuación, al menos una fase de identificación y de caracterización.

50 Recientemente se han introducido en el mercado robots de seguimiento del crecimiento bacteriano, por ejemplo, el BACTEC 9000 de Becton-Dickinson y BacT/ALTER de BioMérieux. Estos robots recurren a la dosis de CO₂ liberado durante la proliferación bacteriana. La utilización de estos robots para hemocultivo permitió aumentar la sensibilidad de los ensayos, en particular, durante hemocultivo y, por consiguiente, disminuir los plazos de respuesta (Lamy y col. (2005) Biotribune 16: 37-39; Croizet y col. (2007) Spectra Biologie 160: 45-51). Estos robots no permiten, sin embargo, identificar específicamente los géneros y especies de bacterias.

55 Más recientemente, la compañía Accelr8 ha comercializado un dispositivo de concentración microfluídica que adsorbe, de forma no específica, las bacterias sobre una superficie de polímero químicamente funcionalizada. En este caso, la detección del crecimiento de un microorganismo precede a su identificación. En efecto, las bacterias se multiplican en primer lugar sobre un soporte y a continuación se identifican gracias a un procedimiento de inmunofluorescencia seguido por un análisis por microscopía. Debe observarse que este procedimiento sigue siendo

60 relativamente laborioso ya que las dos etapas de cultivo y a continuación de detección se realizan sucesivamente.

Procedimientos bastante similares que implican un sistema de impulsos eléctricos para concentrar las esporas de *Bacillus subtilis* para detectarlas mediante un sistema óptico asociado han sido desarrollados por Zourob y col. (2005) Lab Chip 5: 1350-1365. Este procedimiento no implica cultivo y detecta directamente las esporas presentes en una muestra. Necesita, sin embargo, la utilización de microsistemas bastante complejos.

65

También se han propuesto técnicas que utilizan procedimientos de detección electroquímicos. Las más eficaces están basadas en principios impedimétricos (Yang y col. (2004) Anal. Chem.76: 1107-13; Huang y col. (2010) Biosensors & Bioelectronics 25: 1204-11). Estos procedimientos implican a menudo la utilización de un mediador redox utilizado como sonda. En este caso, el medio de medida debe estar suplementado con mediador, normalmente hexacianoferrato, utilizado a concentraciones del orden de 1 a 10 mM. Esto sigue siendo un inconveniente fundamental, ya que el efecto de concentraciones relativamente elevadas (mM) de este tipo de compuestos sobre los microorganismos a detectar sigue siendo poco conocido y puede ser una fuente de interferencias con el medio biológico.

Las técnicas ópticas sin trazador pueden, en principio, prescindir de la adición de compuestos exógenos y son, por lo tanto, más directas. La técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés *surface plasmon resonance*) ha sido aplicada a la detección de lisados bacterianos por Taylor y col. (2006) Biosensors and Bioelectronics 22: 752-758. En este caso, la detección viene precedida por una lisis bacteriana y a continuación, la señal es amplificada por una unión con un anticuerpo secundario específico. Se alcanzan límites de detección situados entre 10^4 y 10^6 bacterias/ml. Por lo tanto, este procedimiento requiere o muestras muy contaminadas o bien un cultivo previo para alcanzar estos umbrales. Además, dado que la detección se realiza en lisado bacteriano, el método no es adecuado para la identificación de bacterias vivas. Del mismo modo, en la solicitud WO 2008/106048, que propone una detección múltiple de microorganismos por SPR, como analitos se utilizan lisados bacterianos.

La solicitud US 2008/0096241 divulga un método para determinar la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico, con ayuda de un dispositivo de SPR. De acuerdo con este método, las bacterias cuya sensibilidad a un antibiótico se desea conocer son adsorbidas a una superficie adecuada para la SPR y funcionalizada por un ligando no específico, antes de añadir el antibiótico a ensayar; durante esta etapa, se mide la señal SPR, que refleja la presencia y el estado de las bacterias adsorbidas. La comparación de las curvas obtenidas con la muestra a ensayar y una muestra de control cuya sensibilidad al antibiótico ensayado se conoce, da la información buscada.

La solicitud WO 2008/106048 se refiere a un aparato para medir la actividad celular inducida por un ligando, comprendiendo el aparato un biosensor óptico que tiene una superficie de contacto, que comprende una zona de agentes de compatibilidad, conectada de manera directa o indirecta a la superficie del biosensor, así como una zona celular, que comprende al menos una célula asociada a al menos un agente de compatibilidad. Este dispositivo no tiene por objeto detectar células en una muestra, y no permite medir simultáneamente la señal proveniente de un ligando específico de los microorganismos y la proveniente de un sensor no específico.

Finalmente, se han descrito otros trabajos, que permiten detectar la germinación de las esporas de *Aspergillus niger* y de *Candida albicans* con ayuda de micro-palanca (Nugaeva y col. (2007) Microsc. Microanal. 13: 13-17; Nugaeva y col. (2005) Biosensors and Bioelectronics 21: 89-856). Este tipo de detección se desarrolla en el aire, en cámara húmeda y presente el inconveniente de no poder realizarse en medio líquido. Por otro lado, solamente es aplicable a la detección de la germinación de esporas fúngicas, previamente capturadas.

Resumen de la invención

La presente invención se obtiene del descubrimiento realizado por los inventores, de que el acoplamiento del cultivo de un microorganismo y de la medida de una señal diferencial generada por la fijación específica del microorganismo por un ligando, es decir que el cultivo y la medida de la señal diferencial se realizan de manera simultánea, permitía rebajar el umbral de detección del microorganismo y disminuir significativamente los tiempos de análisis, con respecto a las técnicas habituales.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de al menos un microorganismo, presente en una muestra, que comprende:

- el cultivo en medio líquido de la muestra en presencia de al menos un ligando específico del microorganismo y de al menos un sensor no específico del microorganismo, produciendo la unión del microorganismo al ligando una primera señal medible y produciendo la unión del microorganismo al sensor una segunda señal medible;
- la determinación de valores de la primera y de la segunda señal para al menos un periodo de cultivo;

en el que se deduce que la muestra comprende el microorganismo cuando los valores de la primera señal y de la segunda señal para un mismo periodo de cultivo son diferentes.

En una realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, cuando la muestra comprende un microorganismo, se determina además la cantidad de microorganismos presentes en la muestra al comienzo del cultivo a partir de la evolución del valor de la primera señal en función del periodo de cultivo.

En otra realización del procedimiento de acuerdo con la invención, cuando la muestra comprende un microorganismo, se determina la sensibilidad del microorganismo a al menos un antimicrobiano a partir de la evolución del valor de la primera señal en función del periodo de cultivo después de la introducción del antimicrobiano en el cultivo.

La presente invención también se refiere a un dispositivo adecuado para la implementación de un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, que comprende al menos una cámara adecuada para el cultivo en medio líquido de un microorganismo, comprendiendo la cámara al menos un ligando específico del microorganismo y al menos un sensor no específico del microorganismo, produciendo la unión del microorganismo al ligando una primera señal medible y produciendo la unión del microorganismo al sensor una segunda señal medible, estando el ligando y el sensor fijados sobre un soporte para estar en contacto con el medio líquido a estudiar.

Descripción detallada de la invención

Como se entiende en el presente documento, un microorganismo es, preferentemente, un organismo procariota o eucariota, unicelular o pluricelular. Sin embargo, cuando el microorganismo es pluricelular, se prefiere que las células que constituyen el microorganismo pluricelular sean homogéneas en términos de diferenciación, es decir que el microorganismo no comprenda células que tienen diferentes especializaciones. Preferentemente, el microorganismo de acuerdo con la invención está vivo, es decir que es capaz de multiplicarse. Por otro lado, el microorganismo de acuerdo con la invención es preferentemente unicelular. A este respecto, el microorganismo de acuerdo con la invención puede ser una forma unicelular de un organismo pluricelular de acuerdo con su fase de desarrollo o de reproducción. Además, un microorganismo de acuerdo con la invención también puede estar constituido por células aisladas o por fragmentos de tejidos aislados de un metazoo. De este modo, el microorganismo de acuerdo con la invención también puede ser una célula de mamífero, particularmente ser humano, tal como una célula tumoral o una célula sanguínea, por ejemplo un linfocito o una célula mononuclear de la sangre periférica. Preferentemente, el microorganismo de acuerdo con la invención es, por lo tanto, un microorganismo, en particular unicelular, seleccionado entre el grupo constituido por una bacteria, un hongo, una levadura, un alga, un protozoo y por una célula aislada de metazoo. De manera particularmente preferida, el microorganismo de acuerdo con la invención es una bacteria, en particular del género *Streptococcus* o *Escherichia*.

La muestra de acuerdo con la invención puede ser de cualquier tipo, en la medida en que pueda comprender un microorganismo. Preferentemente, la muestra de acuerdo con la invención se selecciona entre el grupo constituido por una muestra biológica, una muestra alimentaria, una muestra de agua, particularmente de agua residual, de agua dulce o marina, una muestra de suelo, una muestra de lodo y una muestra de aire. Las muestras biológicas de acuerdo con la invención provienen de organismos vivos o que han estado vivos, particularmente de animales o de plantas. Las muestras que provienen de animales, particularmente de mamíferos, pueden ser líquidas o sólidas, y comprenden, particularmente, sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, líquido sinovial, esperma, secreciones vaginales, secreciones bucales, muestras respiratorias, que provienen en particular de los pulmones, de la nariz o de la garganta, pus, fluido ascítico, o muestras de serosidades cutáneas o conjuntivales.

Preferentemente, las muestras alimentarias de acuerdo con la invención provienen particularmente de alimentos, que pueden ser crudos, cocidos o cocinados, de ingredientes alimentarios, de especias o de platos preparados. También preferentemente, la muestra de acuerdo con la invención no se purifica o se concentra antes de cultivarla de acuerdo con la invención.

Como será claramente evidente para el experto en la materia, el cultivo en medio líquido de acuerdo con la invención se lleva a cabo para obtener una multiplicación del microorganismo eventualmente presente en la muestra cultivada y que se busca detectar. Las técnicas y las condiciones de cultivo de microorganismos en medio líquido son bien conocidas por el experto en la materia, que sabe particularmente definir, para cada microorganismo, el medio nutriente adecuado, la temperatura de crecimiento óptima, por ejemplo 37 °C para numerosas bacterias patógenas de los mamíferos, así como la atmósfera necesaria para la multiplicación de un microorganismo de acuerdo con la invención. Por otro lado, se utilizarán preferentemente medios de cultivo poco selectivos, es decir que permiten el crecimiento de un gran número de microorganismos de tipos diferentes. El periodo de cultivo es también adaptable para cada microorganismo, en función de su velocidad de crecimiento o de su tiempo de generación, es decir el tiempo necesario para la división del microorganismo en dos microorganismos hijos.

Preferentemente, el periodo de cultivo de acuerdo con la invención es superior o igual al tiempo necesario para la producción de al menos dos generaciones sucesivas de microorganismos hijos que permite, por lo tanto, al menos una cuadruplicación, es decir una multiplicación por 4, del número de microorganismos a detectar. El experto en la materia comprenderá fácilmente que no es necesario observar efectivamente la cuadruplicación del número de microorganismos en cultivo, en la medida en que el microorganismo a detectar puede estar ausente de la muestra de acuerdo con la invención, sino que el periodo de cultivo corresponde, como mínimo, al que permite obtener una cuadruplicación del número de microorganismos en un cultivo que contiene efectivamente el microorganismo y que se lleva a cabo en las mismas condiciones que las del procedimiento de la invención. De este modo, se prefiere también que el periodo de cultivo de acuerdo con la invención sea al menos igual a dos veces el tiempo de generación o el tiempo de duplicación del microorganismo a detectar. Como el experto en la materia entenderá bien, el tiempo de generación o de duplicación de acuerdo con la invención es el que puede obtenerse en las condiciones de cultivo de acuerdo con la invención. Generalmente, el periodo de cultivo será inferior a 72 h, 48 h o 24 h. Además, el cultivo podrá detenerse en cuando se haya podido obtener la información buscada, detección, determinación de la cantidad, o sensibilidad a los antimicrobianos.

Ventajosamente, el procedimiento de la invención es sensible y permite detectar la presencia de microorganismos en muestras que contienen concentraciones bajas de microorganismo, por ejemplo iguales a 1 o inferiores a 10, 10^2 o 10^3 microorganismos/ml, que son habitualmente indetectables directamente, particularmente con ayuda de un biosensor. De este modo, se prefiere que el procedimiento de la invención se aplique a muestras que se sospecha que contienen un microorganismo a detectar a una concentración inferior o igual a 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 o 10 microorganismos/ml, o igual a 1 microorganismo/ml.

El ligando de acuerdo con la invención es de cualquier tipo que permita unirse específicamente a un microorganismo o a varios microorganismos emparentados. Puede tratarse particularmente:

- de un receptor natural del microorganismo, tal como un azúcar polisacárido o un lípido complejo, es decir un lípido que comprende al menos un grupo alipídico, particularmente de tipo proteico, glucídico, fosforado, o nitrogenado; de una proteína o de una glucoproteína, tal como plasminógeno por ejemplo, que se une a varias especies bacterianas del género *Streptococcus*; de bacteriófagos o de virus completos, eventualmente inactivados, de fragmentos de bacteriófagos o de virus o de proteínas de bacteriófagos o de virus;
- de inmunoglobulinas, tales como los anticuerpos y sus fragmentos que comprenden la parte variable, dirigidos específicamente a un antígeno, o constante, al que pueden unirse las bacterias del género *Staphylococcus* que comprenden la proteína A, o los fragmentos de receptores de células T (TCR), que comprenden particularmente la parte variable;
- de compuestos sintéticos, particularmente:
 - pequeñas moléculas orgánicas que comprenden en particular de 1 a 100 átomos de carbono,
 - compuestos de naturaleza peptídica, tales como scFv (*single chain variable fragment*),
 - compuestos de naturaleza polinucleotídica, tales como aptámeros, o
 - compuestos de naturaleza polisacárida;
- materiales triturados, lisados o extractos de organismos o de tejidos vivos;
- materiales sintéticos que presentan una superficie de adsorción de microorganismos; o
- mezclas que comprenden dos, o más, de los ligandos definidos anteriormente.

De este modo, el ligando de acuerdo con la invención se selecciona preferentemente entre el grupo constituido por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un scFv, un aptámero, una proteína o una glucoproteína, bacteriófagos completos, eventualmente inactivados, fragmentos de bacteriófagos y proteínas de bacteriófagos.

El sensor de acuerdo con la invención sirve de control negativo. En consecuencia, es preferentemente de una naturaleza semejante a la del ligando. Por otro lado, el sensor de acuerdo con la invención presenta menos afinidad por el microorganismo a detectar que el ligando, es decir que, de acuerdo con la invención, presenta preferentemente una afinidad por el microorganismo inferior al menos 10 veces, particularmente inferior al menos 100 veces, 1000 veces, 10.000 veces, 100.000 o 1.000.000 veces a la del ligando por el microorganismo. En particular, las afinidades del ligando y del sensor por el microorganismo pueden determinarse mediante el método de Scatchard en las mismas condiciones experimentales. De manera más preferida, el sensor de acuerdo con la invención no presenta afinidad por el microorganismo.

Preferentemente, se considera, de acuerdo con la invención, que los valores de la primera señal y de la segunda señal para un mismo periodo de cultivo son diferentes cuando la diferencia de la primera señal y de la segunda señal es superior o igual a dos veces la señal medida del ruido de fondo. La señal medida del ruido de fondo corresponde particularmente a la primera señal medida en ausencia de microorganismo.

Como se entiende en el presente documento, la señal medible de acuerdo con la invención es generada directamente por la fijación o la unión de un compuesto, particularmente un microorganismo, al ligando o el sensor.

En particular, la señal medible de acuerdo con la invención no proviene preferentemente de un mediador, tal como una sonda de oxidorreducción, o de un marcador presente en el medio, o añadido al medio, diferente del ligando y el sensor de acuerdo con la invención. De este modo, preferentemente, la señal medible de acuerdo con la invención no proviene de la fijación adicional de un marcador específico del microorganismo a un microorganismo al que ya se ha fijado el ligando o el sensor.

La señal puede medirse mediante cualquier técnica adecuado para la medida de al menos dos señales simultáneamente, en particular directa, y particularmente por microscopía, por resonancia de plasmón superficial, por espejos resonantes, por medida de la impedancia, por un microsistema electromecánico (MEMS), tal como microbalanzas de cuarzo o "vigas" flexibles, por medida de absorción de la luz, en particular ultravioleta o visible, o también por medida de la fluorescencia, particularmente si el microorganismo es, a su vez, fluorescente, que son bien conocidas por el experto en la materia. A este respecto, como será claramente evidente para el experto en la materia, el marcador definido anteriormente no designa un microorganismo de acuerdo con la invención; de modo que la señal de acuerdo con la invención puede provenir del microorganismo cuando se la ha fijado el ligando o el sensor. La resonancia de plasmón superficial es particularmente preferida de acuerdo con la invención.

Preferentemente, el ligando y el sensor están fijados a un soporte. Más preferentemente, el soporte permite la transducción de la señal producida por la unión de un compuesto al ligando y/o al sensor, particularmente de modo que la señal pueda ser medida por las técnicas mencionadas anteriormente. Dichos soportes son bien conocidos por el experto en la materia y comprenden, particularmente, sustratos transparentes recubiertos de superficies metálicas, continuas o discontinuas, adecuados para la medida por resonancia de plasmón superficial. De este modo, en una realización preferida de la invención, el ligando y el sensor están fijados a un soporte, idéntico o diferente, que es, a su vez, constitutivo de un biochip. Por otro lado, el ligando y el sensor, el o los soportes, o el dispositivo, de acuerdo con la invención, pueden estar comprendidos en un recipiente concebido para recoger líquidos susceptibles de contener microorganismos, o concebido para cultivar microorganismos, tales como un matraz de hemocultivo o una bolsa Stomacher, por ejemplo.

También preferentemente, la señal se mide en tiempo real, particularmente sin que sea necesario efectuar tomas del cultivo para medir la señal. La señal medida es preferentemente registrada, por ejemplo en forma de curva que porta la intensidad de la señal medida en función del tiempo. También es posible registrar imágenes del soporte en el que están fijados el ligando y el sensor de acuerdo con la invención para determinar el grado, o el nivel, de ocupación del ligando y del sensor por el microorganismo.

En realizaciones particulares de la invención, el procedimiento de acuerdo con la invención permite detectar la presencia de varios microorganismos diferentes, determinar la cantidad de diferentes microorganismos presentes en la muestra, o determinar la sensibilidad de diferentes microorganismos a uno o más antimicrobianos, basta entonces que se utilicen varios ligandos específicos respectivamente de los diferentes microorganismos. Dicho procedimiento se denomina entonces múltiple.

Como se entiende en el presente documento, el término «antimicrobiano» se refiere a cualquier compuesto microbicida, que inhibe el crecimiento del microorganismo, o que reduce su proliferación, particularmente a cualquier compuesto antibiótico, bactericida o bacteriostático, tal como eritromicina. Por otro lado, el término «antimicrobiano» se refiere también, particularmente cuando el microorganismo de acuerdo con la invención es una célula tumoral, a cualquier compuesto anticanceroso, particularmente quimioterapéutico, concebido para destruir el microorganismo o para reducir su proliferación.

Preferentemente, cuando se determina la sensibilidad del microorganismo a al menos un antimicrobiano de acuerdo con la invención, la evolución del valor de la primera señal en función del periodo de cultivo proviene, en parte o en total, de una variación del tiempo necesario para la división de un microorganismo, es decir del tiempo de generación, y de este modo de la evolución con el paso del tiempo del número de microorganismos que se unirán al primer ligando. Como comprende bien el experto en la materia, si el tiempo de generación del microorganismo aumenta significativamente, la variación del número de microorganismos será menor que la obtenida en ausencia del antimicrobiano. De este modo, de manera preferida, la evolución del valor de la primera señal no se debe a la destrucción por el antimicrobiano de los microorganismos fijados al primer ligando de acuerdo con la invención.

Descripción de las figuras

Figuras 1, 2 y 3

Las figuras 1 a 3 se obtienen de tres experimentos independientes y representan la variación de reflectividad (dR, eje de ordenadas, en %) medida por formación de imágenes de resonancia de plasmón superficial, en función del periodo de cultivo (eje de abscisas, tiempo en minutos), de un biochip funcionalizado con ayuda (i) de anticuerpos anti-CbpE (estrellas grandes, triplicado) dirigidos contra *Streptococcus pneumoniae*, (ii) de plasminógeno (Plg) (círculos grandes, triplicado), (iii) de IgG no específicas de *S. pneumoniae* (triángulos grandes, triplicado) y (iv) de pirrol únicamente (cuadrados grandes), y colocado en presencia de un cultivo de *S. pneumoniae* cepa R6 a la concentración inicial de 10^2 bacterias/ml (figura 1), 10^3 bacterias/ml (figura 2) y 10^4 bacterias/ml (figura 3), en un volumen de muestra de 500 μ l (es decir, respectivamente 50, 500 y 5000 bacterias). Por otro lado, a modo de controles, y con la notación (c), también se presentan las curvas obtenidas con ayuda del mismo biochip colocado en presencia de un medio de cultivo no sembrado.

Figura 4

La figura 4 representa la variación de reflectividad ΔR_{SPR} , eje de ordenadas, en (%), medida por formación de imágenes de resonancia de plasmón superficial, de un biochip funcionalizado con ayuda de anticuerpos anti-CbpE dirigidos contra *Streptococcus pneumoniae* (cono positivo) y de pirrol únicamente (cono negativo), en presencia de un cultivo de *S. pneumoniae*, en función del periodo de cultivo (eje de abscisas, t en minutos), así como una curva que modeliza la reflectividad del cono funcionalizado con ayuda de anticuerpos anti-CbpE (curva calculada).

Figura 5

La figura 5 representa la variación de reflectividad (dR, eje de ordenadas, en %) de un biochip funcionalizado con ayuda de anticuerpos anti-CbpE dirigidos contra *Streptococcus pneumoniae*, de plasminógeno (Plg), de IgG no específicas de *S. pneumoniae*, y de pirrol únicamente, colocado en presencia de un cultivo de *S. pneumoniae* cepa R6 a la concentración inicial de 10^4 bacterias/ml en dos cubetas en paralelo, en las que se añade

respectivamente a tiempo $t = 250$ min, (i) eritromicina a una concentración final de 40 mg/ml diluida en etanol a la concentración final del 0,08%, (+ ATB), (ii) etanol (EtOH) a la concentración final del 0,08%.

Ejemplos

5

Ejemplo 1: detección de microorganismos en una muestra

Construcción de un biochip

10 Se preparó un biochip de proteínas utilizando el método de electro-polimerización de las proteínas en un prisma con superficie dorada (utilizado como electrodo de trabajo), como lo ha descrito Grosjean y col. (2005) *Analytical Biochemistry* 347: 193-200, a partir de un conjugado de proteína-pirrol en presencia de pirrol libre. En resumen, la electro-polimerización del pirrol libre y de las proteínas acopladas al pirrol-NHS se realiza mediante una punta de pipeta que contiene una varilla de platino que sirve de contraelectrodo; la polimerización se efectúa mediante pulsos eléctricos rápidos de 100 ms (2,4 V) entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, como es descrito particularmente por Guédon y col. (2000) *Anal. Chem.* 72: 6003-6009. Cada especie proteica ha sido depositada en forma de triplicados sobre la superficie dorada del prisma para estimar la reproducibilidad del proceso.

15

Los ligandos utilizados son los siguientes:

20

- Ligandos que reconocen *Streptococcus pneumoniae*

- (i) anticuerpos anti-CbpE preparados de acuerdo con Attali y col. (2008) *Infect. Immun.* 76: 466-76
- (ii) plasminógeno humano (Sigma Aldrich).

25

- Sensores para los controles negativos:

- (iii) IgG de conejo purificados (Sigma Aldrich) o IgG monoclonales anti-toxina botulínica;
- (iv) Pirrol (Tokyo kasei, TCI)

30

Todos estos productos se acoplaron al pirrol y a continuación se depositaron en forma de conos sobre el prisma dorado de acuerdo con un plan de depósito adaptado a la forma de las cubetas que permiten el cultivo de los microorganismos. Cada cubeta está provista de 2 compartimentos independientes que pueden contener dos muestras diferentes entre las cuales un control.

35

Preparación de los cultivos de bacterias

Los neumococos cepa R6 se cultivaron en medio de cultivo Todd Hewitt (TH de *Mast Diagnostic*). El cultivo se detuvo durante la fase de crecimiento óptimo de las bacterias, es decir a una densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600}) de 0,4, lo que corresponde a una concentración bacteriana de aproximadamente 10^8 bacterias/ml. Se realizaron diluciones sucesivas en medio TH para obtener concentraciones de 10^2 a 10^4 bacterias/ml.

40

Medición de formación de imágenes de resonancia de plasmón superficial (SPRi):

45 Se realizaron mediciones de formación de imágenes de tipo SPR utilizando el sistema SPRi-Lab de Genoptics (Orsay, Francia).

El biochip se bloqueó previamente con ayuda de tampón PBS que comprendía un 1% de albúmina de suero bovino (BSA) durante 15 minutos. 0,5 mililitros de muestra que contenía eventualmente bacterias se introduce en el compartimento de «muestra», mientras que medio de cultivo desprovisto de neumococos se introduce en el compartimento de «controles». El sistema se coloca en el recinto del aparato SPRi calentado a 37 °C. La cubeta se tapa para evitar la evaporación del medio de cultivo durante el crecimiento realizado en ausencia de agitación.

50

En paralelo, se realizaron controles de crecimiento. Se prepararon varios tubos que contenían 1 ml del cultivo a 10^3 bacterias/ml y se incubaron en una estufa a 37 °C. La DO_{600} se midió cada hora, para seguir la evolución del crecimiento bacteriano en función del tiempo y compararla con las curvas de crecimiento en SPRi. Las bacterias se cultivaron durante 16 horas.

55

Tabla 1: seguimiento del crecimiento por medición de la densidad óptica a 600 nm

60

Periodo de cultivo	DO
1 hora	0,08
2 horas	0,13
3 horas	0,15

Periodo de cultivo	DO
4 horas	0,17
5 horas	0,19
6 horas	0,25
7 horas	0,46

Estudio de la selectividad

5 Después de la inyección de 500 bacterias, en la figura 2 se observa que las primeras señales, asociadas a la captura de las bacterias por los anticuerpos anti-CbpE así como por el plasminógeno, son detectables después de aproximadamente 300 minutos. Más allá de 400 minutos, una señal se vuelve visible para los conos que portan los controles negativos (fijaciones no específicas). Las señales (c) obtenidas en la cubeta de control, sin siembra bacteriana, siguen siendo negativas

10 Se observa también un crecimiento bacteriano significativo entre 300 y 400 minutos a partir de la Tabla 1.

La inyección de una cantidad menor de bacterias (50 bacterias, figura 1), y de una cantidad superior (5000 bacterias, figura 3), genera también un aumento de señal visible. Los desfases temporales observados corresponden bien a un tiempo de generación del orden de 30 minutos.

15 Ejemplo 2: cuantificación de las bacterias presentes en la muestra de partida

La figura 4 presenta la evolución temporal de las variaciones de la reflectividad medida en formación de imágenes de tipo SPR (ΔR_{SPR}) observadas en el cono funcionalizado con el anticuerpo anti-CbpE y en un cono de control negativo que comprendía únicamente pirrol.

Se ve que, después de un periodo de latencia de aproximadamente 400 minutos, durante el cual la evolución de la señal está enmascarada por el ruido experimental, el aumento de reflectividad es claramente exponencial.

25 A este respecto, la figura 4 muestra también la curva representativa de la función $\Delta R_{SPR} = R_0 2^{(t/\tau)} - R_0$ que modeliza la evolución de ΔR_{SPR} observada en el cono funcionalizado por el anticuerpo anti-CbpE utilizando para el valor de 30 minutos para τ que es típico del tiempo de duplicación de población asociado a *Streptococcus pneumoniae*. El factor de multiplicación R_0 es proporcional al número de microorganismos presentes inicialmente en la muestra. La determinación de este factor permite, por lo tanto, una evaluación cuantitativa de las bacterias presentes inicialmente en la muestra.

A partir de 550 minutos, se produce un alejamiento de este régimen exponencial. Esta reducción del ritmo de crecimiento puede atribuirse a las limitaciones inducidas por modificaciones del medio de cultivo, particularmente su empobrecimiento susceptible de afectar significativamente al crecimiento bacteriano, como sabe el experto en la materia.

La curva del control negativo sigue estando cerca de cero hasta 600 minutos. En lo sucesivo, se puede observar un comienzo de aumento de ΔR_{SPR} atribuible a las interacciones no específicas entre *Streptococcus pneumoniae* y la superficie del cono de control.

40 Ejemplo 3: Inhibición de un crecimiento por adición de antibiótico

La figura 5 presenta el impacto de la adición de un antibiótico (ABT) (eritromicina, Aldrich) dirigido contra los neumococos, a la concentración final de 40 mg/ml, y etanol (EtOH) a la concentración final del 0,08%, sobre la reflectividad de un cultivo de *Streptococcus pneumoniae*, sembrado con 10^3 bacterias/ml, después de 250 min de cultivo.

Se observa que la adición del antibiótico provoca una clara disminución de la pendiente de las curvas que reflejan la reflectividad particularmente marcada para los conos que portan los anticuerpos anti-CbpE y el plasminógeno. La disminución está, por lo tanto, asociada a una inhibición del crecimiento bacteriano. Por otro lado, no se observó ninguna disminución durante la adición de solución de control a la misma concentración de etanol, lo que demuestra que la inhibición del crecimiento bacteriano observado anteriormente es directamente imputable a la acción del antibiótico y no a un efecto de disolvente.

55 Por consiguiente, el procedimiento de cuantificación del crecimiento bacteriano de la invención es útil para establecer un antibiograma.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de al menos un microorganismo presente en una muestra, que comprende:
- 5 - el cultivo en medio líquido de la muestra en presencia de al menos un ligando específico del microorganismo y de al menos un sensor no específico del microorganismo, produciendo la unión del microorganismo al ligando una primera señal medible y produciendo la unión del microorganismo al sensor una segunda señal medible;
 - la determinación de valores de la primera y de la segunda señal para al menos un periodo de cultivo;
- 10 en el que se deduce que la muestra comprende el microorganismo cuando los valores de la primera señal y de la segunda señal para un mismo periodo de cultivo son diferentes.
2. Procedimiento de detección de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el periodo de cultivo es de al menos dos veces el tiempo de generación del microorganismo.
- 15 3. Procedimiento de detección de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el microorganismo se selecciona entre el grupo constituido por una bacteria, un hongo, un alga, un protozoo y una célula aislada de metazoo.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ligando se selecciona entre el grupo constituido por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un scFv, un aptámero (ADN, ARN), una proteína o una glucoproteína, bacteriófagos o virus completos, fragmentos de bacteriófagos o de virus y proteínas de bacteriófagos o de virus.
- 25 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra se selecciona entre el grupo constituido por una muestra biológica, una muestra alimentaria, una muestra de agua, una muestra de suelo y una muestra de aire.
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ligando y/o el sensor están fijados a un soporte de transducción de la señal producida por la unión de un compuesto al ligando y/o al sensor.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la primera y la segunda señal se miden en tiempo real.
- 40 8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la señal se mide por microscopía, por resonancia de plasmón superficial, por espejo resonante, por medida de la impedancia, por microbalanza de cuarzo, por "viga" flexible, por medida de absorción de la luz, o por medida de la fluorescencia de microorganismos fluorescentes.
- 45 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la señal se mide en tiempo real por resonancia de plasmón superficial.
- 50 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la señal medible de acuerdo con la invención no proviene de un mediador o de un marcador presente en el medio, o añadido al medio, diferente del ligando y el sensor de acuerdo con la invención.
- 55 11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que, cuando la muestra comprende un microorganismo, se determina además la cantidad de microorganismos presentes en la muestra al comienzo del cultivo a partir de la evolución del valor de la primera señal en función del periodo de cultivo.
- 60 12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que, cuando la muestra comprende un microorganismo, la sensibilidad del microorganismo se determina a al menos un antimicrobiano a partir de la evolución del valor de la primera señal en función de la duración del cultivo después de la introducción del antimicrobiano en el cultivo.
- 65 13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que se determina la presencia o la cantidad de varios microorganismos diferentes en la muestra.
14. Dispositivo adecuado para la implementación de un procedimiento tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende al menos una cámara adecuada para el cultivo en medio líquido de un microorganismo, comprendiendo la cámara al menos un ligando específico del microorganismo y al menos un sensor no específico del microorganismo, produciendo la unión del microorganismo al ligando una primera señal medible y produciendo la unión del microorganismo al sensor una segunda señal medible, estando el ligando y el sensor fijados a un soporte para estar en contacto con el medio de cultivo líquido.
15. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 14, comprendido en un recipiente concebido para recoger líquidos susceptibles de contener microorganismos y/o para cultivar microorganismos.

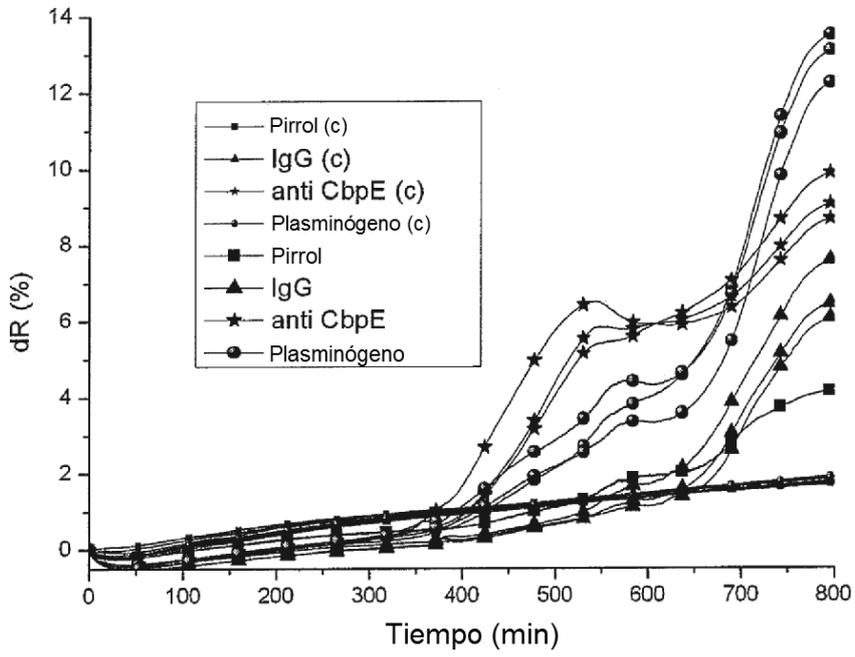


Figura 1

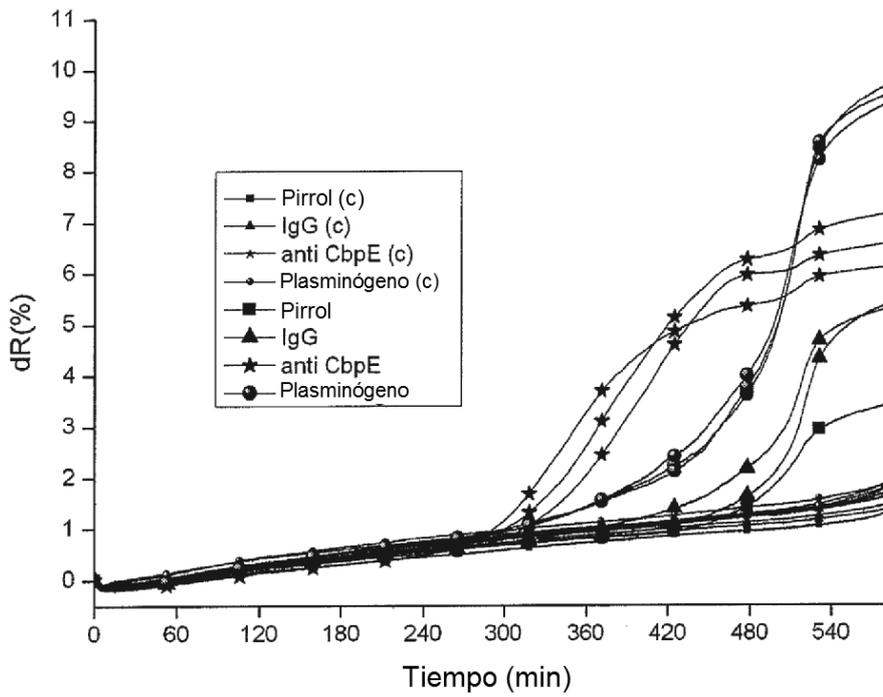


Figura 2

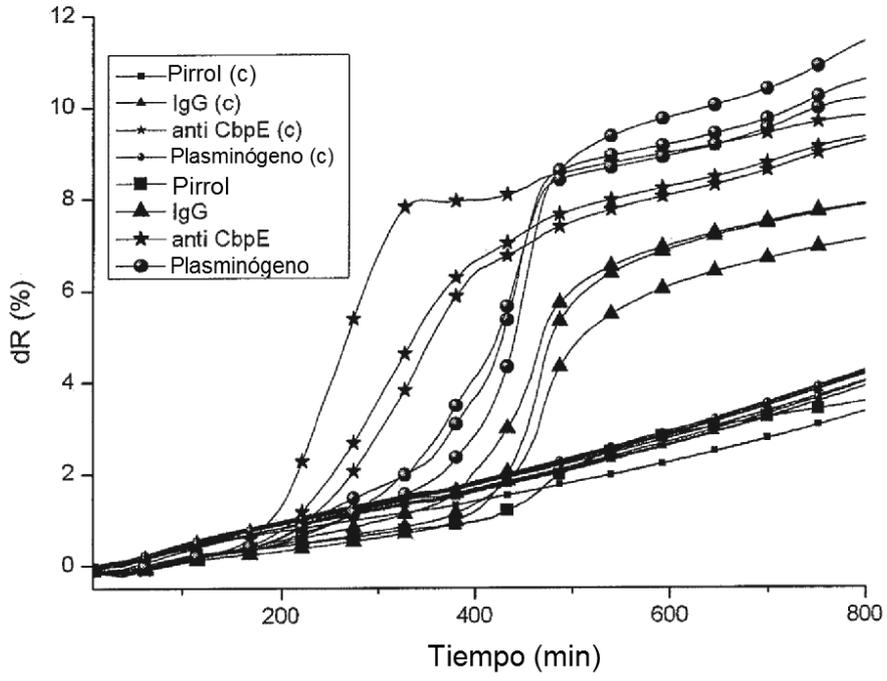


Figura 3

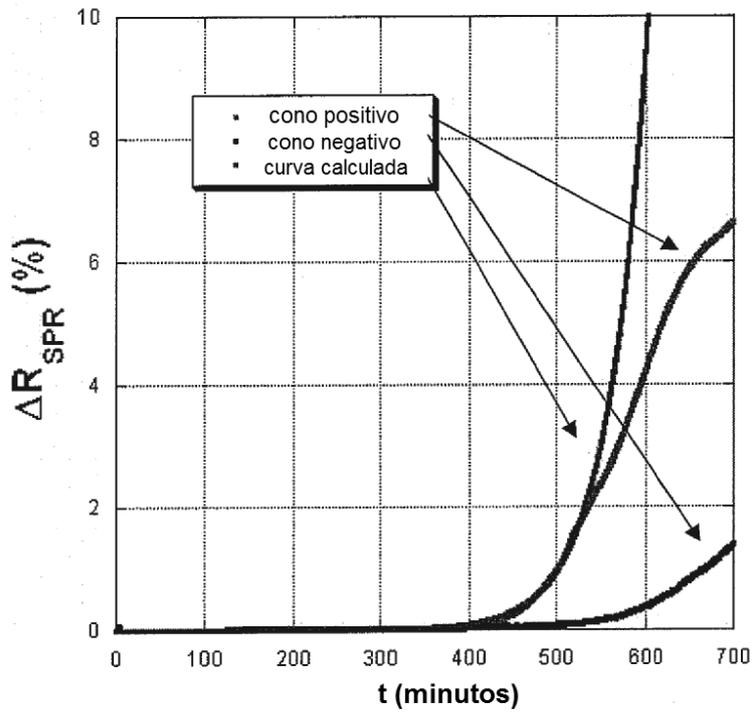


Figura 4

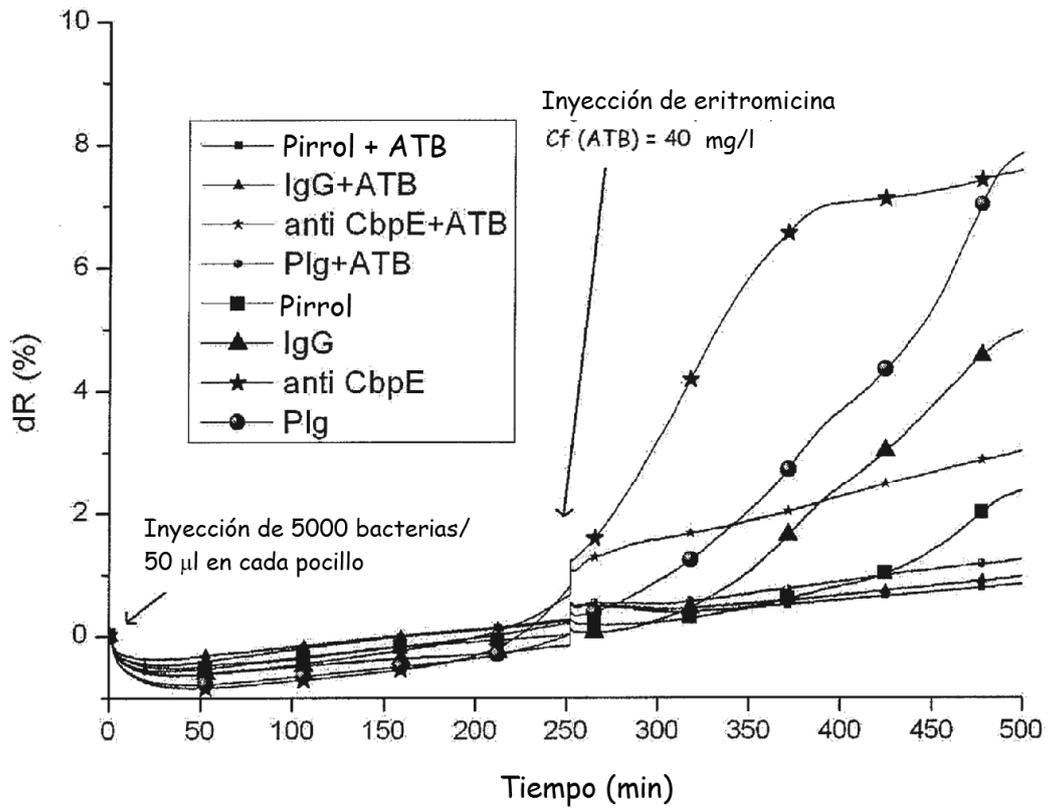


Figura 5