



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 743 042

61 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01) G01N 21/3563 (2014.01) G01N 21/31 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 15.03.2018 E 18161905 (7)
 Fecha y número de publicación de la concesión europea: 12.06.2019 EP 3392342
 - (54) Título: Patrón de ensayo microbiano para uso en la espectrometría de infrarrojos
 - (30) Prioridad:

19.04.2017 DE 102017108278

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 18.02.2020

73) Titular/es:

BRUKER DALTONIK GMBH (100.0%) Fahrenheitstrasse 4 28359 Bremen, DE

(72) Inventor/es:

MAIER, THOMAS y MAUDER, NORMAN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

DESCRIPCIÓN

Patrón de ensayo microbiano para uso en la espectrometría de infrarrojos

Campo de la invención

15

20

30

35

40

45

50

55

La invención se refiere a patrones de ensayo microbianos (en particular bacterianos) para uso en la espectrometría de infrarrojos, especialmente en la espectrometría de infrarrojos por transformadas de Fourier (FTIR), preferiblemente en transmisión, como ayuda y control del proceso en mediciones para la diferenciación, identificación y/o caracterización de microorganismos.

Antecedentes de la invención

En lo que sigue se explicará el estado de la técnica con referencia a un aspecto especial. Sin embargo, esto no debe entenderse como una limitación. Desarrollos posteriores y variaciones útiles de lo conocido del estado de la técnica pueden también aplicarse más allá del marco relativamente estrecho de esta introducción y se deducirán sencillamente por practicantes ejercitados en este sector tras la lectura de la descripción siguiente.

Los espectros IR, que son registrados preferiblemente en transmisión para la identificación microbiana, contienen típicamente una serie de señales de extinción o bandas de absorción a lo largo de un intervalo predeterminado de longitudes de onda, especialmente en el intervalo infrarrojo medio (aproximadamente 4000 - 400 cm⁻¹). Los microorganismos, como muestras a examinar, dejan signos espectrales claros y reconocibles en estos espectros. Estos signos presentan una superposición de aportaciones de todos los componentes celulares, es decir, componentes citoplasmáticos, componentes de la membrana y de la pared celular (es decir, en particular polisacáridos, ADN/ARN, proteínas) y, con ello, reproducen la expresión fenotípica del genoma (ADN/ARN) o bien la huella dactilar genética. Este carácter de huella dactilar es la base para el uso de la espectrometría de infrarrojos en la diferenciación, identificación y caracterización de microorganismos. Para particularidades de estos métodos de medición se remite a la recopilación de Dieter Naumann "Infrared Spectroscopy in Microbiology" en la Encyclopedia of Analytical Chemistry (R.A. Meyers (Ed.), páginas 102-131, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000).

Hoy en día es posible reconocer y compensar de un modo hasta cierto punto fiable oscilaciones y variaciones imprevisibles e indeseadas de ajustes instrumentales y propiedades de un espectrómetro infrarrojo a lo largo de un tiempo determinado de funcionamiento, que pueden influir en la capacidad de reproducción y comparabilidad de mediciones, mediante rutinas de examen y recalibrado automatizadas.

No obstante, las condiciones de medición externas pueden variar a lo largo de un espacio de tiempo de funcionamiento, eventualmente incluso de un registro a otro. A menudo, los espectrómetros infrarrojos no están dotados de capas de soporte de muestras acondicionadas que procuran unas condiciones del entorno constantes y estables, tales como presión, temperatura y humedad durante y entre los distintos registros. Parece plausible que, en particular, un contenido en humedad modificado influya sobre las propiedades espectrales de una muestra preparada, por ejemplo mediante formación de envolturas de hidratación o agua de cristalización y, con ello, puede perjudicar la comparabilidad de muestras similares o incluso de réplicas idénticas. Estas diferencias se manifestarían entonces, en particular en el paso de invierno (aire frío, escasa humedad absoluta) a verano (aire caliente, elevada humedad absoluta). Por lo tanto, existe la necesidad de una vigilancia mejorada del proceso en la espectrometría de infrarrojos con el fin de considerar mejor estas posibles influencias externas y poder evaluar sin demora las mediciones IR.

Son ya conocidos controles del proceso en forma sencilla en el caso de mediciones IR. En la solicitud internacional WO 99/16895 A1, por ejemplo para la vigilancia de la reproducibilidad espectral se miden en cada caso tres veces cuatro cargas de los microorganismos a identificar y luego se evalúa entre sí la similitud de las réplicas respectivas.

Otra misión esencial de la diferenciación, identificación o caracterización de microorganismos mediante espectrometría IR es evaluar entre sí sus relaciones fenotípicas. Se registran y comparan los espectros de absorción específicos de biomasa microbiana, con el fin de determinar e ilustrar las distancias espectrales con ayuda de algoritmos de análisis de agrupaciones, con el fin de que se puedan reconocer las relaciones de parentesco para el usuario. En este caso se establecen los siguientes desafíos: por una parte, es necesaria una elevada fuerza de diferenciación espectral, con el fin de poder mantener separadas, en particular, dos cepas diferentes de la misma especie microbiana; por otra parte, cepas idénticas, aun cuando procedan de diferentes puntos de recogida, deben caer en el caso del análisis de manera fiable en la misma agrupación, es decir, deben presentar en las réplicas aplicadas sobre el portamuestras distancias espectrales intramicrobianas lo más pequeñas posible una con otras y entre sí, con el fin de identificar una reproducibilidad fiable de las mediciones.

La solicitud internacional WO 2008/122975 A2 da a conocer un procedimiento para la detección y/o identificación de bacterias específicas en una muestra no cultivada. El procedimiento comprende pasos que, entre otros, se eligen de (a) obtención de un espectro de absorción (AS) de la muestra no cultivada; (b) determinar los límites de volumen n-dimensionales para las bacterias específicas; (c) tratamiento de datos del AS; y (d) detectar y/o identificar las bacterias específicas cuando la correlación m1 estadística y/o las m características se encuentren dentro del volumen n-dimensional.

ES 2 743 042 T3

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar patrones de ensayo microbianos, así como procedimientos adecuados para su uso, con los que, conociendo la identidad y las propiedades de la biomasa de referencia medida, se puedan determinar y valorar la reproducibilidad y la fuerza de diferenciación espectral de la medición espectrométrica IR, así como de las subsiguientes etapas de evaluación.

Breve descripción de la invención

10

15

20

25

35

40

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un patrón de ensayo microbiano para uso en la espectrometría infrarroja que presente al menos dos recipientes que se puedan volver a cerrar y estancos a los líquidos en estado cerrado, de los cuales cada uno contiene una cantidad predeterminada de biomasa seca de un microorganismo, diferenciándose los microorganismos en los distintos recipientes en al menos una propiedad, la cual se puede elegir del grupo de especie, subespecie, cepa, serovar, patovar, toxivar y variedad, y la diferencia se manifiesta en una distancia espectral intermicrobiana predeterminada, caracterizado porque las biomasa secada está esterilizada.

El empleo del patrón de ensayo tiene lugar preferiblemente de la siguiente manera: junto con las muestras propiamente dichas de microorganismos desconocidos, (al menos) dos microorganismos de referencia, los cuales presentan una distancia espectral intermicrobiana predeterminada entre sí, se aplican por duplicado o también en un número mayor de réplicas, separadas en el espacio, sobre la misma placa portamuestras. Las biomasas de referencia se miden por espectrometría IR antes de las muestras "auténticas" a identificar.

Con el fin de pasar el ensayo e identificar en conjunto como válida la medición de la placa portamuestras, las distancias espectrales microbianas entre los dos microorganismos de referencia deben ser mayores que una distancia mínima B espectral, con el fin de demostrar una fuerza de diferenciación espectral suficiente. En el caso de aplicación por duplicado, pueden calcularse cuatro valores de distancia espectral intermicrobiana, de los cuales cada uno debe cumplir la condición, con el fin de pasar el ensayo. Si se aplican más de dos réplicas por microorganismo, por ejemplo de cinco a diez, entonces, alternativamente a un cumplimiento del 100% de la condición, un determinado cuantil de distancias espectrales intermicrobianas, por ejemplo dos a diez por ciento, preferiblemente cinco por ciento, no puede mantener las condiciones límites sin conducir a un fracaso del ensayo. Por ejemplo, 5 x 5 manchas de muestras proporcionan distancias espectrales intermicrobianas del 25% entre las réplicas de las dos biomasas de referencia; un pequeño número de ellas, por ejemplo uno de estos valores de distancia menor que B podría ser tolerado, sin identificar como inválida en conjunto a la medición.

Consideraciones similares son válidas en variaciones de este procedimiento naturalmente también para la distancia máxima A espectral intermicrobiana en el caso de un correspondiente número elevado de réplicas aplicadas. Con el fin de detectar una medida mínima de reproducibilidad espectral, las distancias espectrales intermicrobianas de las réplicas una con otra y entre sí, o al menos un gran cuantil de las mismas (> 90%) deberían ser menores que esta distancia máxima A determinada.

En lugar de proveer una medición IR con una marca (de advertencia) para una medición errónea, un practicante experto puede utilizar el no cumplimiento (parcial) de los criterios de ensayo también para mirar con detalle los espectros IR y sacar de ello conclusiones que posibiliten repetir, en la medida de lo posible, las mediciones en el caso de condiciones modificadas y optimizadas. Por una parte, un contenido en humedad optimizado en la cavidad del portamuestras puede conducir a mejores resultados. Cuando la relación de señal-a-ruido de las bandas de absorción sea demasiado baja, pueden añadirse varias tomas de la misma mancha de la muestra, con el fin de mejorar la base de datos para la evaluación. Finalmente, también puede examinarse la preparación de las muestras de microorganismos sobre el portamuestras, en el sentido de si fueron aplicadas con un grosor de capa ampliamente uniforme. Si esto no se confirma, la preparación se puede realizar de nuevo fijándose particularmente en esta propiedad; y estos ensayos de optimización pueden ir acompañados y ser examinados con el patrón de ensayo microbiano.

Junto a los planos de jerarquía taxonómicos evidentes, especie y subespecie, diferentes propiedades detalladas de microorganismos pueden suponer una distancia espectral intermicrobiana. El término "cepa" (más exactamente "cepa de cultivo" o "línea de procedencia", en inglés *strain*) describe, por ejemplo, una población que se multiplicó a partir de un único organismo y se almacenó en un punto de recolección (a menudo estatal) para cepas de microorganismos, añadiéndose a la cadena de nombres con género, especie, subespecie y tipo de variedad una denominación de cepa normalizada internacional. Los distintos organismos de una cepa son genéticamente idénticos, por el contrario cepas diferentes varían ligeramente en su dotación genética y, por lo tanto, ofrecen una pluralidad de posibles combinaciones de cepas con diferentes propiedades espectrales y distancias que pueden ser adecuadas para el uso como patrón de ensayo microbiano en la espectrometría IR.

Otras características de diferenciación espectrales pueden exteriorizarse, por ejemplo, en serotipos o serovares.

Con serotipo o serovar (forma abreviada de *Serovarietas*) se designan variedades dentro de subespecies de bacterias que pueden ser diferenciadas con ensayos serológicos: se diferencian por antígenos en la superficie de las células y se identifican en la Microbiología clásica mediante anticuerpos específicos. La jerarquía taxonómica para serotipos es la siguiente: género > especie > subespecie (subsp.) > serotipo, por ejemplo con el nombre de la especie binómico ampliado *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhi, forma abreviada *Salmonella* Typhi.

Un patovar (del griego pathos "afección") es una cepa bacteriana o un grupo de cepas con las mismas propiedades que se pueden delimitar de otras cepas dentro la especie o subespecie en virtud de su patogenicidad. Los patovares se caracterizan con un complemento de tres o de cuatro al nombre binómico de la especie. La bacteria *Xanthomonas axonopodis*, por ejemplo, que puede provocar cáncer en cítricos, tiene diferentes patovares con diferentes especializaciones del huésped: *X. axonopodis* pv. citri es una de ellas, la abreviatura "pv." significa "patovar". También las cepas virulentas de patógenos humanos poseen patovares, los cuales, sin embargo, aquí se caracterizan por complementos del nombre. La bacteria del intestino, la mayoría de las veces totalmente inofensiva, *Escherichia coli* presenta, por ejemplo, los patovares sumamente peligrosos *E. coli enterohemorrágica* (EHEC), *E. coli enteropatógena* (EPEC), *E. coli formadora de enterotoxinas* (ETEC), *E. coli enteroinvasiva* (EIEC), *E. coli enteroagregativa* (EAEC), así como *E. coli difusa adherente* (DAEC). Los patovares pueden abarcar, de nuevo, diferentes serotipos: así, en el caso de EHEC existen muchos serotipos conocidos, en donde se suprime aproximadamente el 60 por ciento de todos los serotipos EHEC identificados a O157, O103 y O26. Particularmente peligroso es el sero-subtipo O157/H7. Se entiende que para patrones de ensayo microbianos en el uso cotidiano de laboratorio para el hombre se han de preferir claramente microorganismos inofensivos.

10

25

30

35

60

En un sentido amplio, los microorganismos pueden dividirse también en variedades que se diferencian por otras características médicamente relevantes, en particular por el comportamiento de resistencia frente a antibióticos (en particular, antibióticos de beta-lactama y antibióticos de glicopéptidos), pero también por la formación de toxinas ("toxivares") o por la propensión a bacteriófagos iguales o similares ("fagovares"). En términos muy generales, se habla de "biovares", cuando una selección de microbios de una especie o subespecie posee características comunes biológicas. Un ejemplo de una variedad resistente a antibióticos es MRSA: *Staphylococcus aureus resistente a meticilina*.

La biomasa secada está esterilizada, con el fin de prevenir contaminaciones microbianas que falsifican la medición; en particular, puede presentar gránulos secados en vacío. Esta forma de provisión se adecúa particularmente para la elaboración rápida de una suspensión estándar de ensayo que sirve para la generación de réplicas sobre el portamuestras en el laboratorio, cuando hayan de llevarse a cabo mediciones IR próximas en el tiempo.

En una forma de realización preferida, los microorganismos pertenecen a diferentes cepas de una especie bacteriana. Como ejemplo se puede mencionar la especie *Escherichia coli*, en donde la biomasa secada en los diferentes recipientes puede abarcar, en una realización particularmente preferida, las cepas DH5α (DSM 6897) y ML3 (DSM 1058). Dos cepas bacterianas permiten la determinación de una distancia espectral intermicrobiana definida, con el fin de vigilar y valorar de este modo la reproducibilidad entre las réplicas de una cepa y la fuerza de diferenciación espectral entre las distintas mediciones de las distintas cepas. Es particularmente ventajoso que las cepas se manifiesten regularmente en muestras microbiológicas y, por lo tanto, presenten una operatividad suficiente; en el caso de cepas de *E. coli* es este el caso. La distancia espectral intermicrobiana se puede exteriorizar en una distancia de dos componentes principales de un análisis de componentes principales. En formas de realización preferidas adicionales, la distancia espectral puede ser, sin embargo, también euclídica, lo cual corresponde a la diferencia de los vectores espectrales n-dimensionales. La dimensionalidad puede comenzar, en cada caso en función de la resolución o del intervalo del número de onda elegido, en el intervalo de dos cifras y puede alcanzar hasta varios cientos o más, por ejemplo 20 < n < 2000; en particular 400 < n < 600; por ejemplo, n = 500.

Los recipientes pueden comprender tapas de cierre roscado para la apertura y el cierre de nuevo seguros. También después del llenado de un disolvente en los recipientes para la preparación de una suspensión de microorganismos, estos últimos se pueden almacenar a lo largo de un espacio de tiempo prolongado (p. ej., de hasta diez semanas) para el uso ulterior, sin que se perjudique la fuerza de expresión espectral.

Conforme a un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de un patrón de ensayo microbiano de este tipo, que presenta: - provisión de un portamuestras para la espectrometría infrarroja que presenta un campo a base de puntos de muestras, típicamente 48, 96 o 384 en una disposición de matriz-filas-columnas; - resuspensión de la biomasa en los recipientes mediante el llenado de un disolvente, por ejemplo agua destilada y/o desionizada; - retirada de una cantidad predeterminada de la suspensión de cada uno de los recipientes y su aplicación sobre un número predeterminado de puntos de muestras, preferiblemente por duplicado o triplicado; - secado de la suspensión sobre los puntos de muestras, eventualmente bajo la acción del calor y la convección; - registro de espectros infrarrojos de los puntos de muestras, preferiblemente en transmisión; - cálculo de distancias espectrales intermicrobianas entre firmas espectrales en los espectros infrarrojos de los distintos puntos de muestras; y - consulta de si las distancias espectrales se encuentran fuera de un intervalo predeterminado, en donde los espectros IR pueden ser caracterizados por el portamuestras en conjunto con una indicación (de advertencia), correspondiente cuando este sea el caso.

En diferentes formas de realización, las distancias espectrales pueden calcularse en un determinado intervalo de números de onda, preferiblemente entre aproximadamente 1300 y 800 cm⁻¹ para reducir la influencia de bandas de absorción de agua perturbadoras, a partir de las firmas espectrales microbianas, y corresponden a una distancia predeterminada, por ejemplo directamente a las distancias euclídicas de los vectores espectrales. Un análisis de un número mayor de espectros podría tener lugar también aquí con ayuda de un análisis de agrupación jerárquico (HCA). O bien el cálculo tiene lugar con ayuda de un análisis de componentes principales de las firmas espectrales

microbianas, y las distancias corresponden entonces a una distancia predeterminada en el espacio del componente principal. Procedimientos alternativos para la diferenciación de diferentes microorganismos del sector del aprendizaje mecánico vigilado son, por ejemplo ANN (artificial neural network analysis; análisis de red neuronal artificial), PLS-DA (partial least-square discriminant analysis; análisis de discriminación con mínimos cuadrados parciales), así como SVM (support vector machines; método de vector de apoyo). Sin embargo, en estos casos, las distancias espectrales no son decisivas en primer término, sino la correcta asociación de los espectros de ensayo a las clases esperadas.

Adicionalmente a las distancias intermicrobianas pueden calcularse distancias espectrales intramicrobianas (es decir, distancias entre réplicas del mismo microorganismo) entre las firmas espectrales en los espectros infrarrojos de los diferentes puntos de muestras con el fin de examinar la reproducibilidad espectral.

Preferiblemente, el intervalo (i) predeterminado de la distancia espectral intramicrobiana se extiende hasta una distancia máxima A, que es una medida para una reproducibilidad de las tomas, y (ii) de la distancia espectral intermicrobiana de una distancia mínima B, que es una medida para una fuerza de diferenciación espectral en las tomas. En diferentes formas de realización, un número pequeño (p. ej., dos a diez por ciento, en particular cinco por ciento) de distancias espectrales entre los registros espectrométricos IR de los distintos puntos de muestras individualizadas no cumplen las condiciones de separación, sin que un hallazgo de este tipo conduzca a una caracterización negativa o incluso a una declaración de invalidez de todas las mediciones de este portamuestras, en la medida en que lo haga una mayoría importante de las distancias.

Mediante la agitación de los recipientes se puede sustentar la resuspensión en el sentido de una distribución uniforme de las células de microorganismos suspendidas, en donde, en particular, recipientes con cierres roscados garantizan una protección fiable del entorno frente a la salida indeseada de aerosoles microbianos, así como son adecuados para un almacenamiento durante semanas de la suspensión remanente para el posterior uso. Eventualmente, la resuspensión puede ser sustentada adicional o alternativamente también mediante pipeteado mixto con el recipiente abierto.

En diferentes formas de realización, una durabilidad de la suspensión puede ser prolongada mediante la adición de etanol. Según una medida de este tipo, las suspensiones preparadas se pueden almacenar durante semanas, en particular durante hasta diez semanas, para el uso posterior en la vigilancia de la medición y el control del proceso.

Es particularmente practicable evaluar los espectros infrarrojos utilizando una transformación de Fourier, dado que de esta forma se pueden detectar señales de extinción repetitivas desconocidas con una elevada sensibilidad.

30 Breve descripción de las figuras

10

15

40

45

50

Para una mejor comprensión de la invención se remite a las siguientes Figuras. Los elementos en las Figuras no se representan necesariamente a escala, sino que deben ilustrar (en su mayor parte de modo esquemático) en primer término los principios de la invención. En las Figuras, elementos correspondientes entre sí en las distintas vistas se caracterizan por símbolos de referencia iguales.

La Figura 1A muestra esquemáticamente la primera parte de un uso a modo de ejemplo de un patrón de ensayo microbiano.

La Figura 1B ilustra esquemáticamente una medición por espectrometría IR en transmisión mediante muestras secadas con un ejemplo correspondiente de un espectro de extinción.

La Figura 1C explica esquemáticamente diferentes pasos de tratamiento de un espectro de extinción, que se llevaron a cabo antes de la evaluación.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente el posible resultado de una determinación de las distancias espectrales para réplicas de dos cepas bacterianas en un espacio del componente principal bidimensional.

Descripción detallada

Mientras que la invención ha sido representada y explicada con ayuda de un cierto número de formas de realización, personas expertas en el sector reconocerán que pueden realizarse diferentes modificaciones en forma y detalle en las mismas, sin desviarse del alcance de la enseñanza técnica definida en las reivindicaciones adjuntas.

La preparación de la biomasa seca para el patrón de ensayo IR microbiano puede tener lugar de la siguiente manera: los diferentes microorganismos de referencia se cultivan durante la noche en un medio nutricio plano (p. ej., agar de Columbia - sangre de cordero). Las células cultivadas se inoculan en algunos cientos de mililitros de caldo nutricio (p. ej., LB - en inglés *lysogeny broth*), con el fin de que entonces puedan crecer a 37°C bajo ligera agitación de unos pocos cientos de *rpm* durante algunas horas (p. ej., 12 a 24 h). El caldo enriquecido de este modo puede dividirse entonces en recipientes de centrifugación diferentes y separarse por centrifugados algunos miles de g durante algunos minutos. El sobrenadante se desecha y el sedimento microbiano remanente se resuspende en agua con el fin de separar restos del caldo nutricio. Una centrifugación renovada y una resuspensión renovada en agua,

eventualmente complementada mediante la adición de un disolvente prótico tal como etanol, proporcionan una suspensión, cuyo contenido en microorganismos puede ser determinado a través de una medición de la densidad óptica (p. ej., conforme al patrón de McFarland). Si la concentración de los microorganismos suspendidos es suficiente, la suspensión puede distribuirse en partes alícuotas en recipientes de material sintético y secarse en ellos, por ejemplo en vacío a temperaturas ligeramente elevadas, con el fin de formar directamente en el recipiente un sedimento liberado de líquido y listo para el uso.

Las Figuras 1A a 1C representan esquemáticamente un transcurso posible para el uso de un patrón de ensayo microbiano.

La biomasa secada (2) para los dos microorganismos de referencia puede proporcionarse en recipientes de material sintético (4) con una tapa de cierre roscado (6). Para la preparación de una muestra de referencia, se retira la tapa de cierre roscado (6) y se introduce una cantidad de disolvente, tal como agua destilada o desionizada, con el fin de resuspender los gránulos (2) secos. Este proceso puede ser sustentado, después del cierre renovado de los recipientes (4), mediante un ligero sacudimiento o, adicional o alternativamente, mediante la introducción y la extracción a presión repetidas de una punta de pipeta ("pipeteado mixto") sin formación de burbujas (no mostrado).

10

30

35

40

45

50

55

60

Después de algunos minutos, cuando se haya "disuelto" la biomasa sólida y ya no sea visible, las tapas (6) se pueden retirar de nuevo y se puede recoger una cantidad de la suspensión microbiana (8) de los recipientes (4) y aplicar sobre un número de puntos de muestras (A-H; 1-12) sobre un portamuestras (10) de espectrometría IR. Esto puede tener lugar, por duplicado, triplicado o en un número mayor de réplicas, tal como se muestra esquemáticamente para dos portamuestras (10) con una disposición de 96 puntos de muestras (ocho filas A-H, doce columnas 1-12). Básicamente, se cumple que con un número creciente de las réplicas del patrón de ensayo se puede mejorar la base estadística de la determinación de la distancia espectral; no obstante, a costa de un número correspondiente menor de puntos de muestras para las muestras analíticas realmente a identificar sobre el portamuestras, que aquí no se representan por motivos de claridad. Las gotas de la suspensión del patrón de ensayo se secan, eventualmente sustentado mediante la irradiación de calor, a una temperatura moderadamente elevada con respecto a la temperatura ambiente y/o a una corriente de aire.

Los microorganismos del patrón de referencia (Nº 1, Nº 2) se miden en el mismo paso que la muestra propiamente dicha con un espectrómetro IR (12a, 12b), preferiblemente en transmisión tal como se muestra. Un ejemplo de un espectrómetro de este tipo es el TENSOR II FT-IR de Bruker Optik GmbH. El resultado de una medición de este tipo es un espectro de extinción tal como se representa a modo de ejemplo abajo en la Figura 1B. Se representa la densidad óptica (D.O.) frente al número de ondas, como es habitual en espectrometría. Los espectros registrados se derivan dos veces y en cada caso se alisan a través de un número determinado de puntos de datos. A continuación, se elige un intervalo del número de onda, en el que las bandas de absorción de células microbianas, que son provocadas particularmente mediante hidratos de carbono y proteínas, destacan óptimamente frente a influencias de fondo tales como bandas de absorción de agua y, por lo tanto, proporcionan la mejor relación señal-a-fondo. El intervalo entre aproximadamente 1300 y 800 cm⁻¹ es particularmente adecuado para ello; Figura 1C.

Una normalización del vector prepara el intervalo espectral elegido para la subsiguiente evaluación en relación con medidas de distancia espectrales. Una posibilidad de determinar la distancia espectral a partir de las señales de extinción específicas para el microorganismo se compone en un análisis de componentes principales. En este caso, es decisivo que los microorganismos para los diferentes recipientes se elijan de modo que se puedan representar de manera fiable, apenas pero claramente en diferentes componentes. La distancia espectral intermicrobiana está definida ciertamente en esencia por un límite inferior, pero no debería elegirse a pesar de ello demasiado grande con el fin de permitir emitir un dictamen sobre la fuerza de diferenciación espectral en el límite del rendimiento del espectrómetro infrarrojo. Tampoco debería ser demasiado pequeña con el fin de prevenir el riesgo de un solapamiento ocasional, ocasionado por la dispersión, de las nubes de datos de los componentes principales que muestran una determinada varianza de una medición a otra.

La Figura 2 muestra a modo de ejemplo y de forma esquemática el resultado de un análisis del componente principal sobre la base de espectros IR de dos cepas bacterianas. La distancia espectral intramicrobiana entre las réplicas del mismo microorganismo no debe sobrepasar un valor máximo A determinado, ya que, de lo contrario, no se podría confirmar la identidad, lo cual pondría en duda la calidad de la medición. Igualmente, la distancia espectral intermicrobiana entre las diferentes réplicas de los distintos microorganismos empleados no debe rebasar por abajo un determinado límite inferior B, ya que, de lo contrario, la fuerza de diferenciación espectral de la medición no sería suficiente. Cuanto mayor sea el número de réplicas de las suspensiones de microorganismos individuales, tanto más fiable estadísticamente son las afirmaciones derivables de las mismas en donde, sin embargo, también se ha de tener en cuenta el espacio existente para las muestras de medición microbianas propiamente dichas en el portamuestras.

Como se puede ver en la Figura 2, en el caso de la medición repetida de los mismos microorganismos se forman dos nubes de datos individuales indicadas en el espacio del componente principal bidimensional que, en relación con las réplicas individuales de un organismo se encuentran estrechamente unas junto a otras, pero están claramente separadas de las réplicas del otro organismo respectivo (en el ejemplo mostrado > 0,15 unidades arbitrarias). Dado que el patrón de ensayo microbiano se examina en el mismo proceso de medición que las

ES 2 743 042 T3

muestras microbianas reales, esta distancia permite en los componentes principales calculados emitir una afirmación sobre la fuerza de diferenciación espectral del espectrómetro IR. Al mismo tiempo, mediante las distancias espectrales intramicrobianas de las distintas réplicas del mismo microorganismo una con otra y entre sí se evalúa la reproducibilidad de la medición IR. Si puntos de datos individuales de las réplicas del mismo organismo rebasaran la distancia máxima A permitida, esto sería de evaluar como un signo de un problema de la reproducibilidad de las mediciones. Las mediciones realizadas en paralelo de muestras reales se pueden proveer entonces de una marca correspondiente. Si se produjera incluso que las nubes de datos de los distintos microorganismos se entremezclaran, la fuerza de diferenciación espectral no se garantizaría, lo cual reduce la calidad de la identificación, si no incluso el resultado de la identificación o caracterización del portamuestras resultante bajo las condiciones de medición indicadas se ha de caracterizar como no fiable.

5

10

15

20

25

El empleo de un análisis del componente principal se ha de entender en lo que antecede no como limitante, sino como un ejemplo explicativo. Principios de la presente divulgación se pueden realizar también con procedimientos alternativos para la determinación de distancias espectrales, por ejemplo mediante las distancias euclídicas nativas y/o con ayuda de análisis de agrupaciones jerárquicas. También sería posible una clasificación de los espectros de ensayos con ANN (artificial neural network analysis), PLS-DA (partial least-square discriminant analysis) o SVM (support vector machines) correspondientemente entrenado previamente.

En lo que antecede se explican los principios de la invención con ayuda de dos microorganismos diferenciables espectralmente entre sí. Sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que también pueden utilizarse más de dos microorganismos adecuados para la provisión de un patrón de ensayo microbiano para la espectrometría infrarroja. La idea base se puede ampliar a este respecto de forma arbitraria.

La invención se describe en lo que antecede con referencia a diferentes ejemplos de realización particulares. Sin embargo, se entiende que se pueden modificar diversos aspectos o detalles de las realizaciones descritas, sin desviarse del alcance de la invención. En particular, características y medidas dadas a conocer en relación con diferentes formas de realización pueden combinarse de manera arbitraria, en la medida en que esto le parezca practicable al experto en la materia. Además de ello, la descripción que antecede sirve solamente para la explicación de la invención y no para la limitación del alcance de protección que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 1. Patrón de ensayo microbiano para uso en la espectrometría infrarroja, que presenta al menos dos recipientes que se puedan volver a cerrar y estancos a los líquidos en estado cerrado, de los cuales cada uno contiene una cantidad predeterminada de biomasa seca de un microorganismo, diferenciándose los microorganismos en los distintos recipientes en al menos una propiedad, y la diferencia se manifiesta en una distancia espectral intermicrobiana predeterminada, caracterizado por que las biomasa secada está esterilizada.
- 2. Patrón de ensayo microbiano según la reivindicación 1, caracterizado por que la al menos una propiedad se elige del grupo de especie, subespecie, cepa, serovar, patovar, toxivar y variedad.
- 3. Patrón de ensayo microbiano según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la biomasa secada presenta gránulos secados en vacío.
 - 4. Patrón de ensayo microbiano según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que los microorganismos pertenecen a diferentes cepas de una especie de bacteria.
 - 5. Patrón de ensayo microbiano según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que los recipientes presentan tapas de cierre roscado.
- 15 6. Uso del patrón de ensayo microbiano según una de las reivindicaciones 1 a 5, que presenta:
 - provisión de un portamuestras para la espectrometría infrarroja que presenta un campo a base de puntos de muestras,
 - resuspensión de la biomasa en los recipientes mediante el llenado de un disolvente,
- retirada de una cantidad predeterminada de la suspensión de cada uno de los recipientes y su aplicación sobre un número predeterminado de puntos de muestras,
 - secado de la suspensión sobre los puntos de muestras,

5

35

- registro de espectros infrarrojos de los puntos de muestras,
- cálculo de distancias espectrales intermicrobianas entre firmas espectrales en los espectros infrarrojos de los distintos puntos de muestras; y
- consulta de si las distancias espectrales se encuentran fuera de un intervalo predeterminado.
 - 7. Uso según la reivindicación 6, caracterizado por que las distancias espectrales se calculan a partir de las firmas espectrales microbianas y corresponden a una distancia predeterminada.
 - 8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado por que el intervalo de números de onda se encuentra entre aproximadamente 1300 y 800 cm⁻¹.
- 30 9. Uso según una de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que se calculan distancias espectrales intramicrobianas entre las firmas espectrales en los espectros infrarrojos de los diferentes puntos de muestras con el fin de examinar la reproducibilidad espectral.
 - 10. Uso según la reivindicación 9, caracterizado por que el intervalo predeterminado de la distancia espectral intramicrobiana se extiende hasta una distancia máxima A, que es una medida para una reproducibilidad de las tomas, y de la distancia espectral intermicrobiana de una distancia mínima B, que es una medida para una fuerza de diferenciación espectral en las tomas.
 - 11. Uso según una de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado por que el disolvente para la resuspensión comprende agua destilada y/o desionizada.
- 12. Uso según una de las reivindicaciones 6 a 11, caracterizado por que la resuspensión es sustentada mediante agitación de los recipientes o pipeteado mixto.
 - 13. Uso según una de las reivindicaciones 6 a 12, caracterizado por que a los espectros IR se les agrega una indicación (de advertencia), cuando una distancia espectral se encuentra por fuera del intervalo predeterminado.
 - 14. Uso según una de las reivindicaciones 6 a 13, caracterizado por que sobre el portamuestras se aplica una pluralidad de réplicas de las suspensiones de microorganismos.

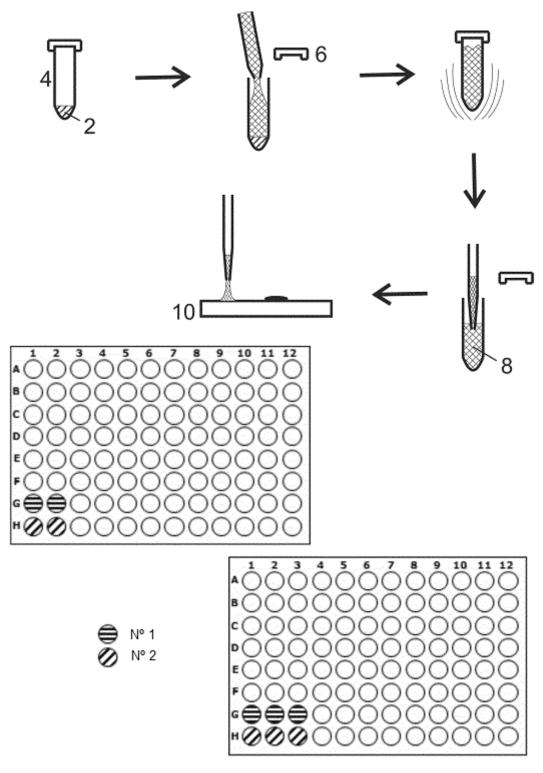
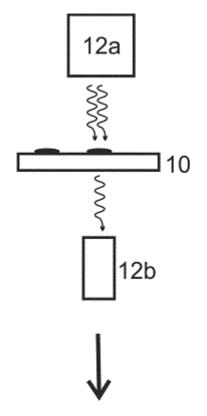


Figura 1A



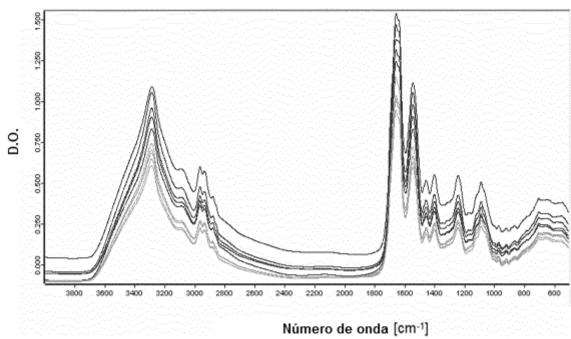


Figura 1B

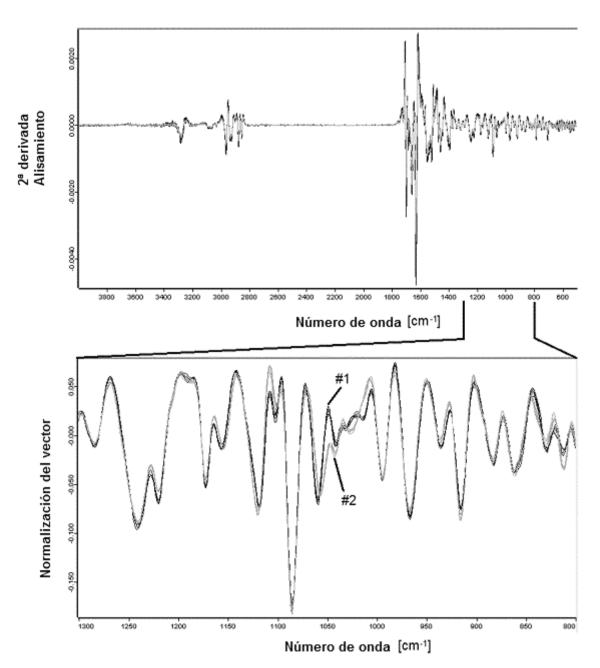


Figura 1C

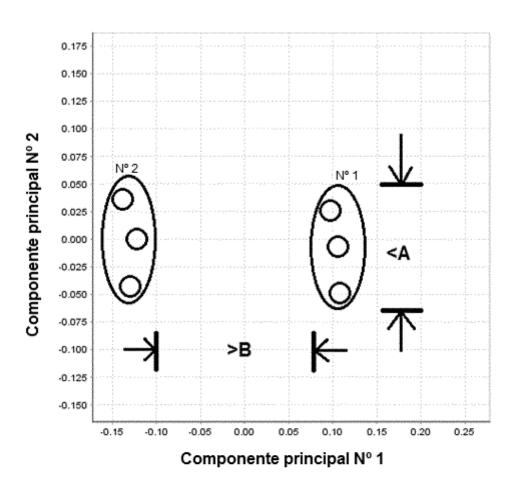


Figura 2