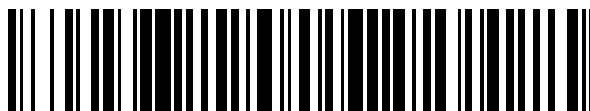


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 255**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00	(2006.01)
C12Q 1/04	(2006.01)
G01N 33/543	(2006.01)
G01N 33/569	(2006.01)
B01L 3/00	(2006.01)
C12M 1/28	(2006.01)
C12M 1/34	(2006.01)
C12Q 1/68	(2008.01)
G01N 27/26	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2011 PCT/FR2011/051624**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12004540**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2011 E 11743840 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2591122**

54 Título: **Procedimiento de detección y de identificación directa de un microorganismo en una muestra biológica diluida en un caldo de enriquecimiento**

30 Prioridad:

08.07.2010 FR 1055574

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2020

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'etoile, FR**

72 Inventor/es:

**ATRACHE, VINCENT;
COLIN, BRUNO;
LAFAY, AURELIE;
MAKROUF, BOUCHRA;
MONTES, PASCAL;
MOSTICONE, DAVID;
RAYMOND, JEAN CLAUDE;
SOFIA, THIERRY y
VIMONT, ANTOINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 787 255 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 de identificación directa de un microorganismo en una muestra biológica diluida en un caldo de enriquecimiento

5 La presente invención se refiere, de manera general, al campo del análisis, por ejemplo, el análisis biológico. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección directa y en tiempo real de un microorganismo en una muestra diluida o en suspensión en un caldo de enriquecimiento, dentro de un contenedor cerrado.

10 El análisis microbiológico necesita técnicas precisas y cuyo tiempo de obtención del resultado debe ser lo más corto posible.

15 En el campo médico, es necesario prever y diagnosticar el riesgo infeccioso: cuanto más rápido y preciso sea el diagnóstico, más eficaz será el tratamiento de los enfermos y se minimizará el riesgo de transmisión. El planteamiento es similar para la salud animal.

En el campo agroalimentario, la problemática es idéntica, distingue no obstante:

20 * los microorganismos patógenos y sus toxinas, cuyo estudio se aplica a las materias primas, productos intermedios, productos terminados comercializados,

* los microorganismos no patógenos, utilizados como indicadores de calidad del proceso de producción, desde las materias primas hasta los productos terminados, a lo largo de toda la cadena, y

25 * las bacterias de interés tecnológico, tales como los fermentos.

La detección rápida y precisa de contaminaciones sospechosas permite controlarlas e iniciar así acciones correctivas.

30 Técnicamente, el análisis microbiológico puede implementar una o varias fases de pre-enriquecimiento y/o de enriquecimiento, una o varias fases de detección, una o varias fases de enumeración de los microorganismos. Para aplicaciones particulares tales como el control microbiológico agroalimentario, se puede requerir también una fase de confirmación, con el fin de cumplir con las normas en vigor en este campo.

35 En la actualidad no existe método para detectar un microorganismo diana en una cantidad de muestra inicial importante sin hacer uso de una etapa de enriquecimiento.

40 La fase de pre-enriquecimiento y/o de enriquecimiento hace uso de medios de cultivo, selectivos o no, que tienen como objetivo promover el crecimiento de los microorganismos diana en las muestras biológicas o ambientales, limitando al mismo tiempo el crecimiento de las floras no diana. Los medios se utilizan frecuentemente en contenedores de tipo bolsa de plástico estéril, en las que se ponen en contacto con las muestras alimentarias o ambientales, con fines de resuspensión y enriquecimiento de los microorganismos buscados. Esta fase es necesaria a fin de responder a las necesidades, que es poner de manifiesto la presencia inicial potencial de al menos un microorganismo diana en una cantidad de muestra muy variable y eventualmente muy grande, por ejemplo 25 gramos (g) a 375 g diluido en de

45 225 a 3375 mililitros (ml) en el medio de cultivo. Al final de esta etapa de enriquecimiento, se extrae un alícuota (de 5 microlitros (µl) a 5 ml) para realizar la etapa de detección de los microorganismos diana. Ahora bien, en este alícuota, es necesario disponer de una cantidad suficiente de microorganismos diana para asegurar su detección sistemática.

50 La fase de detección se basa históricamente sobre el cultivo de los microorganismos sobre medios de agar, para poner en evidencia los caracteres metabólicos de los microorganismos buscados. Se utilizan clásicamente unos sustratos enzimáticos específicos. Estos sustratos enzimáticos están generalmente compuestos de dos partes, una primera parte específica de la actividad enzimática a poner de manifiesto, denominada también parte diana, y una segunda parte que actúa de marcador, denominada parte marcador, generalmente constituida por un cromóforo o un fluoróforo. Mediante la elección de estos sustratos, dependiendo de si hay reacción o no, es posible caracterizar la naturaleza de un microorganismo o discriminar diferentes grupos de microorganismos. Así, la aparición o la desaparición de una coloración o de una fluorescencia será la firma de un género o de un tipo de microorganismos. A este respecto, la utilización de medios cromogénicos permite la detección y la identificación simultáneas de los gérmenes buscados. Simplifica el proceso y disminuye sustancialmente el plazo de obtención del resultado. Se citará, a título de ejemplo

55 concreto, los medios ChromID® de la solicitante. Estos medios cromogénicos se basan en la detección de caracteres metabólicos específicos de los gérmenes buscados como, por ejemplo, la actividad enzimática beta-glucuronidasa para *Escherichia coli*.

60 Los inmunoensayos constituyen otra de las tecnologías utilizadas para la prueba de detección. Hacen uso de las características inmunogénicas de los microorganismos buscados. De manera no exhaustiva, se pueden citar las técnicas ELISA (Análisis de inmuoadsorción enzimática), por competición o de tipo sándwich.

65

Finalmente, las técnicas de biología molecular, basadas en los caracteres genómicos de los microorganismos buscados, se utilizan también para detectar e identificar los microorganismos diana. Se citarán a título de ejemplo las técnicas de amplificación clásicas tales como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y la NASBA (Secuenciación de ácido nucleico basada en Amplificación), que pueden acoplarse con técnicas de detección en tiempo real conocidas por el experto en la técnica.

Sin embargo, la utilización de todas estas técnicas necesita abrir la bolsa al final de la fase de pre-enriquecimiento/enriquecimiento a fin de recuperar un alícuota del homogeneizado y realizar la etapa de detección.

La fase de confirmación, por su parte, está más particularmente relacionada con el análisis microbiológico en el campo agroalimentario. En efecto, cuando el resultado de los métodos desarrollados anteriormente es positivo, es necesario confirmar la presencia del patógeno buscado. Esto impone una prueba complementaria y la utilización de un principio de detección diferente del utilizado durante el primer análisis. Las técnicas descritas anteriormente se utilizan tantas veces como se desee para esta confirmación.

La identificación completa y precisa de un microorganismo en una muestra necesita, por lo tanto, la sucesión de varias etapas: enriquecimiento, detección y confirmación. La estandarización de las pruebas utilizadas rutinariamente permitió la automatización de los métodos de detección que siguen siendo, no obstante, largos de realizar. Un inconveniente del estado de la técnica es, en efecto, que estas etapas se realizan de manera secuencial y necesitan un gran número de manipulaciones que requieren mucho tiempo, afectando así en el tiempo necesario para aportar resultados.

Por otro lado, las técnicas descritas anteriormente necesitan una o varias aberturas de las bolsas de enriquecimiento a fin de extraer unos alícuotas. Ahora bien, esto es aún más perjudicial cuando el número de muestras negativas durante el cribado ("screening" en inglés) (especialmente en industrias agro-alimentarias) es elevado. Por lo tanto, es interesante para manipularlo no tener que volver a abrir los contenedores para conocer el resultado de positividad/negatividad de la muestra considerada.

Frente a los problemas técnicos provocados por el estado de la técnica considerado anteriormente, uno de los objetivos esenciales de la presente invención es proporcionar un procedimiento simplificado para la detección, la identificación y la confirmación de los microorganismos presentes en unas muestras, en particular agroalimentarias.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la detección, la identificación y la confirmación de los microorganismos, que limita las manipulaciones de la muestra contenida en el contenedor, limitando así los riesgos de contaminación, o del personal que manipula la muestra, o de la muestra en sí.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la detección y la identificación de los microorganismos, que permite disminuir el tiempo necesario para el análisis de la muestra.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la detección, la identificación y la confirmación de los microorganismos sobre el volumen total de la muestra durante el enriquecimiento, que permite aumentar manifiestamente la sensibilidad, incluso la especificidad, de la medición.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento que permita aumentar considerablemente la cadencia de análisis de las muestras.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento que permita realizar la detección múltiple.

Otro objetivo de la presente invención es mejorar la trazabilidad del análisis debido a la reducción drástica de las etapas de manipulación de las muestras.

Estos objetivos, entre otros, se resuelven mediante la presente invención, que se refiere a un procedimiento de detección, de al menos un microorganismo presente en una muestra colocada en un contenedor cerrado, comprendiendo dicho método esencialmente las etapas siguientes:

a) poner en contacto en el contenedor, dicha muestra con (i) al menos un medio de cultivo, (ii) un sistema de revelación apto para permitir la detección, (iii) un soporte apto para capturar el o los microorganismos a detectar, estando dicho soporte constituido de partículas magnéticas sobre las cuales se fija al menos una pareja de unión específica del o de los microorganismos a detectar, seleccionándose dicha pareja de unión específica entre los anticuerpos, los fragmentos Fab, los fragmentos Fab', las proteínas de fagos recombinantes o no, los fagos,

b) cerrar el contenedor,

c) colocar el contenedor en condiciones aptas para permitir el crecimiento del o de los microorganismos,

d) aplicar un campo magnético para acercar las partículas magnéticas,

e) detectar en el interior de dicho contenedor cerrado, con la ayuda de un medio de detección, la presencia del o de los microorganismos fijados sobre el soporte de captura, realizándose la detección en tiempo real y poniéndose en evidencia por aparición de una aglutinación en tiempo real de las partículas magnéticas.

Por sistema de revelación, se entiende cualquier molécula capaz de acoplarse con los microorganismos o las parejas de unión de dichos microorganismos y que permiten, por sus propiedades de transducción (fluorescencia, coloración, radioactividad especialmente), revelar la presencia de dichos microorganismos.

Según otro modo de realización particular, el procedimiento según la invención comprende una etapa intermedia c') que consiste en transferir todo o parte de la mezcla constituida por dicha muestra, el medio de cultivo, el soporte apto para capturar el o los microorganismos a detectar y eventualmente un sistema de revelación, del contenedor, denominado entonces principal, hacia al menos un segundo contenedor denominado secundario, en el que es posible realizar eventualmente un enriquecimiento secundario, añadiendo previamente en dicho contenedor secundario los elementos nutritivos y los agentes selectivos *ad hoc*. Tal enriquecimiento secundario permite aumentar la población del o de los microorganismos diana con respecto a la de los microorganismos no diana, lo que mejora la especificidad.

Ventajosamente, el medio de detección se escoge del grupo que comprende: los medios de detección eléctricos y, especialmente, electroquímicos, los medios de detección ópticos, los medios de detección acústicos, los medios de detección térmicos, los medios de detección mecánicos, los medios de detección magnéticos.

Según un modo particular de realización, es bastante posible acoplar los medios de detección a fin de realizar, por un lado, la detección y, por otro lado, efectuar simultánea o subsiguientemente la confirmación. Por ejemplo, es posible realizar la detección del o de los microorganismos diana mediante un biosensor electroquímico. Si la fijación de los microorganismos diana se efectúa mediante parejas de unión específicas, la etapa de detección constituye entonces una etapa de identificación. Un análisis óptico de los microorganismos fijados específicamente sobre el biosensor a nivel de la zona de análisis por un dispositivo de detección óptico permite entonces confirmar la identificación de los microorganismos. Si el dispositivo de detección óptico es un espectrómetro Raman, un análisis del espectro Raman por comparación con una base de datos de espectros de referencia que corresponden a los diferentes microorganismos diana, permite entonces confirmar la identificación de dicho microorganismo.

Según otro modo de realización particular, es posible realizar la detección y la confirmación con la misma tecnología. Así, si el medio de detección es un medio óptico, tal como un medio de medición de la fluorescencia intrínseca, es particularmente ventajoso realizar la detección de los microorganismos diana por aparición de fluorescencia intrínseca. La respuesta es entonces una respuesta sí (presencia de fluorescencia)/no (ausencia de fluorescencia). Si hay fluorescencia, un análisis espectral de la señal de fluorescencia por comparación con una base de datos de espectros de referencia que corresponden a los diferentes microorganismos diana, permite entonces identificar dicho microorganismo y, por lo tanto, confirmar la detección de la presencia de dicho microorganismo.

Según un modo particular del procedimiento según la invención, el contenedor es una bolsa de homogeneización. Puede también tratarse de contenedores rígidos, tales como frascos, botellas o pastilleros.

Según otro modo de realización particular del procedimiento según la invención, el medio de detección se conecta con un sistema de análisis de los datos.

De manera ventajosa, la conexión entre el medio de detección y el dispositivo de análisis de los datos es una conexión por cable o una conexión inalámbrica.

Se describe también un biosensor electroquímico para la detección de al menos un microorganismo presente en una muestra colocada en un contenedor cerrado. Dicho biosensor comprende un soporte que comprende:

* al menos un electrodo de detección, revestido de al menos un polímero electroactivo, sobre el cual se fija, mediante uno de sus extremos, al menos un oligonucleótido monocatenario o bicatenario, estando dicho segundo extremo de dicho oligonucleótido unido a al menos una pareja de unión del o de los microorganismos a detectar, específica o no específica;

* al menos un contra-electrodo.

Ventajosamente, el polímero electroactivo se escoge del grupo que comprende el polipirrol, el poliacetileno, la poliazina, el poli(p-fenileno), el poli(p-fenileno vinileno), el polipireno, el politiofeno, el polifurano, el poliselenofeno, la polipiridazina, el policarabazol, la polianilina.

Según un modo particular de realización, el polímero electroactivo comprende al menos un mediador electroquímico. Tal mediador electroquímico se escoge del grupo que comprende el ferroceno, la quinona, y los derivados de estos o cualquier otro mediador bien conocido por el experto en la materia.

Según un modo de realización alternativo, el mediador electroquímico se encuentra en forma libre en el medio de cultivo. Tal mediador puede, por ejemplo, ser la pareja ferricianuro/ferrrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, la pareja cloruro de iridio $[\text{IrCl}_6]^{3-/4-}$, la rutenio hexamina $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$.

5 De manera preferida, la unión entre el oligonucleótido y la pareja de unión del o de los microorganismos se realiza mediante al menos una pareja de unión biotina-estreptavidina o biotina-avidina.

10 Cuando el oligonucleótido es monocatenario, una biotina está fijada sobre el extremo 3' de dicho nucleótido, permitiendo el extremo 5' la fijación de este último sobre el polímero electroactivo, especialmente por enlace covalente. Utilizando una pareja de unión también biotinilada, es fácil después fijar esta al extremo 3' del oligonucleótido mediante una molécula de estreptavidina o de avidina.

15 Cuando el oligonucleótido es bicatenario, la primera cadena se fija, especialmente, por enlace covalente al polímero electroactivo por su extremo 5'. La segunda cadena, por su parte, se biotinila a su extremo 5' permitiendo la fijación de la pareja de unión también biotinilada por medio de una molécula de estreptavidina o de avidina.

20 Ventajosamente, la pareja de unión se escoge del grupo que comprende: los anticuerpos, los fragmentos Fab, los fragmentos Fab', las proteínas de fagos recombinantes o no, los fagos.

Los objetivos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor a la luz de la descripción detallada siguiente, en relación con los dibujos, en los que:

25 - la figura 1 representa una bolsa de pre-enriquecimiento y/o de enriquecimiento en combinación con un biosensor electroquímico.

- la figura 2 representa una vista de frente del biosensor electroquímico.

30 - la figura 3A es una representación de la superficie del sensor electroquímico en ausencia de microorganismo.

- la figura 3B es una representación de la superficie del sensor electroquímico en presencia de microorganismos.

35 - la figura 4 es una representación esquemática de un sistema de análisis de la bolsa de pre-enriquecimiento/enriquecimiento con biosensor electroquímico.

- la figura 5 es un gráfico de mediciones por espectrometría de impedancia obtenidas durante la detección de *E. coli* O157:H7 en una muestra alimentaria.

40 - la figura 6 es un gráfico de mediciones por espectrometría de impedancia obtenidas durante la detección de *Listeria innocua* en una muestra alimentaria.

- la figura 7 es una representación esquemática de un sistema de análisis por detección óptica en una bolsa de pre-enriquecimiento/enriquecimiento con soporte de captura sensibilizado, según un primer modo de realización.

45 - la figura 8 es una representación esquemática del sistema de análisis tal como se representa en la figura 7, en una posición de la bolsa que permite leer el soporte de captura sensibilizado.

- la figura 9 es una representación esquemática de un soporte de captura sensibilizado.

50 - la figura 10 es una representación esquemática del soporte de captura sensibilizado, representado en la figura 8, después del análisis, cuyo resultado es positivo.

- la figura 11 es una representación esquemática de un sistema de análisis por detección óptica en una bolsa de pre-enriquecimiento/enriquecimiento con un soporte de captura sensibilizado, según un segundo modo de realización.

55 Según un primer ejemplo descrito, pero que no forma parte de la invención, es un procedimiento de detección, incluso de identificación de microorganismo que consiste en utilizar una bolsa de homogeneización de plástico y estéril, clásicamente denominada bolsa Stomacher®. Tal bolsa está referenciada 10 en la figura 1. Esta bolsa 10 está constituida de dos hojas plásticas sustancialmente rectangulares, 12 y 14, solidarizadas la una a la otra por 3 de sus
60 lados, a fin de definir un espacio interior destinado a recibir el medio de cultivo y la muestra a analizar. Comprende accesoriamente un filtro 16 de forma sustancialmente rectangular y unido a las hojas 12 y 14 por un lado, separando el espacio interior en dos. La bolsa comprende finalmente un biosensor 18. Este biosensor es un biosensor electroquímico, representado en detalle en la figura 2. El biosensor 18 está cogido en sándwich entre las hojas 12 y 14, de manera que una parte 181 que corresponde a la zona de detección se encuentre en el espacio interior de la
65 bolsa 10, mientras que una parte que corresponde a la zona de conexión se encuentra en el exterior de la bolsa, para permitir la conexión del microchip con un dispositivo de análisis de los datos. Esto se explicará más adelante.

En la figura 2 se representa el biosensor electroquímico 18 en detalle. Como se ha explicado antes, el biosensor 18 está constituido de una zona de análisis 181 y de una zona de conexión 182. La zona de análisis comprende ocho electrodos de trabajo 20, dispuestos alrededor de un electrodo central, denominado contraelectrodo 22. Por otro lado, la zona de análisis comprende un electrodo de referencia 24, en forma de un anillo abierto posicionado alrededor del contraelectrodo 22. El conjunto de estos electrodos está unido independientemente a diez bornes de conexión 26, mediante pistas conductoras 28. Los bornes de conexión están realizados del mismo material que los electrodos de trabajo. Este material es preferiblemente oro. No obstante, se puede utilizar cualquier otro material conductor bien conocido por el experto en la materia, como el carbono, el platino, o el diamante. El material que constituye el soporte de los electrodos es un material polimérico, tal como poliimida. No obstante, se puede considerar la utilización de cualquier otro material que presente unas propiedades equivalentes y bien conocido por el experto en la materia.

Cabe señalar que la configuración de los electrodos presentados en la figura 2 es sólo una configuración entre otras, y no es de ninguna manera limitativa de la extensión de la protección conferida por la presente solicitud de patente.

Las figuras 3A y 3B representan un electrodo de trabajo en corte transversal, a nivel microscópico, respectivamente en ausencia o presencia de microorganismos.

A nivel de los electrodos de trabajo, se observa una superposición de tres capas. La primera de estas capas 30 es la capa de polímero que constituye el soporte del biosensor. La capa intermedia 32 es la capa de material conductor, típicamente oro. Finalmente, la capa 34 es una capa de polímero conjugado electroactivo. Tal polímero es, por ejemplo, un polipirrol. Tales polímeros son bien conocidos por su carácter conductor y electroactivo. Se conoce también que los polipirroles conservan su conductividad y su electroactividad cuando algunos ciclos pirrol se sustituyen en la posición 3 o 4 con unos grupos funcionales. Unos polímeros que llevan este tipo de grupos funcionales se describen en el documento WO-A1-95/29199, Garnier *et al.* (Synthetic Metals, 100: 89-94, 1999) Ho-Hoang *et al.* (Synthetic Metals, 62: 277-280, 1994), Ho-Hoang *et al.* (J. Mater. Chem., 6 (7), 1107-1112, 1996), y Korri-Youssoufi *et al.* (Materials Science and Engineering, C1 5, 265-268, 2001). Se pueden injertar así diferentes moléculas sobre los grupos funcionales llevados por un monómero de polipirrol. Así, el documento WO-A1-95/29199 describe la síntesis de un polipirrol obtenido por electro-oxidación a un potencial superior o igual a 0,8V/ECS. La síntesis del polipirrol por oxidación electroquímica conduce a la formación de una película electroactiva en la superficie del electrodo, más precisamente sobre un sustrato conductor o en forma de una película auto-soportada. Se trata de un método de inmovilización indirecta de los oligonucleótidos en el polipirrol. Los monómeros de pirroles sustituidos en la posición 3 del núcleo pirrol con unos grupos funcionales se diluyen en una solución de monómeros no sustituidos, los cuales inmovilizarán los grupos funcionales durante su electropolimerización por inclusión en la cadena de las unidades funcionales. En una segunda etapa, un antiligando, tal como un oligonucleótido, un polinucleótido o un péptido, se acopla químicamente sobre los grupos funcionales del polímero precursor. El polímero así obtenido conserva sus propiedades conductoras y electroactivas. Estos polímeros pueden utilizarse, por lo tanto, para detectar un analito que interactúa específicamente con el antiligando injertado sobre el polímero por la medición de una diferencia de potencial o de una variación de corriente: el documento WO-A1-00/77523 describe también el acoplamiento químico de un antiligando, tal como un oligonucleótido, sobre un polímero precursor que lleva unos grupos funcionales.

Puede tratarse también de un método de inmovilización directa de los oligonucleótidos en el polipirrol por electrocopolimerización. Los monómeros de pirroles sustituidos en la posición 3 del núcleo pirrol con unos oligonucleótidos se diluyen en una solución de monómeros no sustituidos, los cuales inmovilizarán los oligonucleótidos directamente durante su electrocopolimerización por inclusión en la cadena de las unidades funcionales.

En esta capa de polímero electroactivo se injerta una cadena doble de ácido nucleico 36, mediante el extremo 5' de una de estas cadenas, llevando la cadena complementaria una molécula de biotina 38 en su extremo 5', de manera que es posible una unión a una pareja de unión específica 40 unida también a una biotina 42 por medio de una molécula de estreptavidina 44. La pareja de unión específica 40 representada en las figuras 3A y 3B es un anticuerpo. Puede tratarse indiferentemente de uno o varios anticuerpos monoclonales o policlonales. Puede también tratarse de un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab, Fab'2, así como cualquier anticuerpo obtenido por modificación o recombinación genética, y específico de un microorganismo particular.

Alternativamente, la pareja de unión específica puede ser un fago o una proteína de fago recombinante, que se fija específicamente a los microorganismos diana. Tales proteínas y su utilización para la captura de bacterias se han descrito, entre otras, en la patente EP-B-1 356 080.

Se precisa que la estructura representada en las figuras 3A y 3B es sólo un ejemplo entre otros y no es de ninguna manera constitutivo de una limitación de la invención. En efecto, a título de variante, se puede considerar fijar la molécula antiligando directamente sobre el electrodo sin utilizar la cadena doble de ácido nucleico.

A fin de realizar el análisis, el biosensor electroquímico, solidario de la bolsa de homogeneización, se pone en contacto con la muestra dispersa, el medio de cultivo y un mediador electroquímico, tal como la pareja ferricianuro-ferrocianuro. En ausencia de microorganismos, se produce un intercambio de electrones entre el polímero conjugado electroactivo y dicho sistema redox presente en el medio de reacción. Esto se materializa en la figura 3A. El intercambio electrónico

se transforma en corriente eléctrica y se mide por espectroscopia electroquímica, con la ayuda de un potenciostato, tal como se explicará más adelante.

5 Cuando la muestra contiene unos microorganismos 44, estos se capturan por las moléculas antiligandos 40. La presencia de microorganismos en las proximidades del electrodo provoca una saturación estérica, que perturba y disminuye el flujo electrónico entre el electrodo modificado por el polímero conjugado electroactivo y dicho sistema redox presente en el medio de reacción. Esta modificación se mide entonces por impedanciometría y se caracteriza por la resistencia de transferencia de carga, resistencia cuyo valor aumenta cuando la bacteria se captura (resultado positivo).

10 El sistema de medición de los resultados de análisis está representado esquemáticamente en la figura 4, según un primer modo de realización. Como se puede observar en esta figura, la bolsa 10, por medio de su biosensor 18, se conecta a un potenciostato 50. Esta conexión se realiza gracias a un conector 52 conectado a la zona de conexión 182 del biosensor 18. El conector 52 se prolonga por un cable 54 unido al potenciostato 50. El potenciostato, por su parte, está unido a un sistema informático 56 apto para registrar y analizar los datos de impedanciometría.

15 Con fines de detección de los microorganismos, la bolsa de homogeneización 10 se incuba preferiblemente el tiempo para permitir el crecimiento de dichos microorganismos. Esta incubación puede realizarse clásicamente en un horno a una temperatura comprendida entre 25 y 45°C. El tiempo de incubación puede variar de 3 a 72 horas, en función de la cantidad inicial de microorganismos presentes en la muestra y del tipo de microorganismo a detectar.

20 Según un primer modo de realización, la medición de impedancia se puede realizar en punto final. En efecto, la bolsa de homogeneización se incuba el tiempo considerado como necesario y suficiente para el crecimiento de los microorganismos, y después se saca del horno de incubación y se conecta al sistema de medición de impedancia descrito anteriormente. Se realiza entonces la medición de impedancia y se compara el resultado con un valor de impedancia de referencia. Tal medición de impedancia es posible en la medida en la que uno o varios electrodos de trabajo 20 están recubiertos con el polímero conjugado electroactivo y/o de una molécula antiligando no específica del microorganismo a detectar. La medición de impedancia a nivel de este o estos electrodos constituye el valor de impedancia de referencia. En la medida en la que la diferencia entre el valor de impedancia a nivel de los electrodos de detección (electrodos sobre los cuales se fijan directa o indirectamente las moléculas antiligandos del microorganismo diana) y el valor de impedancia de referencia es superior a un valor umbral, la detección de los microorganismos es efectiva.

25 Un segundo modo de realización es en modo discontinuo, a saber por mediciones puntuales de impedancia durante la incubación. En este caso, la bolsa de homogeneización se saca del horno de incubación y se conecta al sistema de medición de impedancia, durante el tiempo necesario para dicha medición, y después se vuelve a incubar. El intervalo entre dos mediciones puede estar comprendido entre 30 segundos y 2 minutos. Este segundo modo de realización presenta como principal ventaja, con respecto al primer modo de realización, permitir detectar la presencia de los microorganismos después de un tiempo de incubación más corto.

30 Finalmente, en un tercer modo de realización, que es el modo de realización preferido, está previsto disponer en el interior del horno de incubación un medio de conexión del biosensor al sistema de medición de impedancia. Puede tratarse de un sistema de conexión por cable o inalámbrico. Tal modo de realización es particularmente ventajoso ya que permite realizar una medición a intervalo regular en el interior de las bolsas de homogeneización sin tener que manipular estas últimas. Por otro lado, la medición a intervalo regular de la impedancia permite realizar una detección en tiempo real de los microorganismos. Asociado a un sistema de alerta informática del personal técnico cuando se realiza una detección, este último no está entonces ya limitado por el flujo de trabajo que consiste en realizar unas mediciones sucesivas en el tiempo. Debe entonces únicamente intervenir cuando un microorganismo se detecta en una bolsa.

35 Un medio de conexión por cable está constituido por cualquier medio que permite conectar dos dispositivos electrónicos entre sí, a fin de permitir la transmisión de datos. En particular, un medio de conexión por cable puede ser un sistema de conexión de tipo serie (norma RS 485, RS 232), de tipo USB (Universal Serial Bus), de tipo red (Ethernet), de tipo paralelo (GPIB) o cualquier otro medio equivalente.

40 Un medio de conexión inalámbrico es un dispositivo de emisión-recepción de ondas radioeléctricas. Puede tratarse por ejemplo de un sistema Wifi (norma 802.11b), Bluetooth (norma 802.15) o también ZigBee (norma 802.15.4).

45 Según una alternativa, el medio de adquisición de datos puede ser un lector RFID (Radio Frequency Identification), una tarjeta Labjack o cualquier otro medio bien conocido por el experto en la materia.

50 Según un segundo ejemplo, descrito, pero que no forma parte de la invención, el procedimiento se puede realizar gracias a un medio de detección óptica. Este medio de detección puede ser independiente del soporte de captura. Es el caso, por ejemplo, de un sensor óptico, tal como una cámara. Alternativamente, el medio de detección óptico y el soporte de captura pueden ser sólo uno. Es el caso, por ejemplo, de una fibra óptica cuyo extremo desempeña la función de soporte de captura.

5 Tal alternativa se representa en la figura 7. Una bolsa de homogeneización 10 cerrada, tal como se ha descrito anteriormente, se incuba con una muestra alimentaria 60, constituida aquí por una muestra de carne picada. Esta muestra alimentaria 60 se sumerge en un medio de cultivo 62, implementado con un sistema de revelación. Un soporte de captura sensibilizado 64, mantenido en su sitio en la bolsa mediante cualquier medio apropiado, se coloca también en la bolsa de homogeneización 10 y se sumerge en el medio de cultivo 62. El soporte de captura sensibilizado 64 se funcionaliza por al menos una pareja de unión específica de un microorganismo diana a detectar. El soporte de captura puede estar constituido de cualquier soporte apto para permitir la fijación de parejas de unión específicas y bien conocido por el experto en la materia. A título de ejemplo no limitativo, un soporte de captura adecuado puede ser de poliestireno irradiado, tal como el comercializado por la compañía Nunc/Thermo Scientific (Cat. No. 472230). Tal soporte de captura se representa esquemáticamente en la figura 9, bajo la referencia 64. La parte inferior puede estar ventajosamente, y según un modo de realización preferido, dividida en dos. La zona referenciada 641 puede sensibilizarse con una solución de parejas de unión (anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab' o Fab'2, proteínas de fago), mientras que la parte superior 642 permanece virgen de cualquier pareja de unión y tiene así una función de control negativo.

20 El soporte de captura se funcionaliza por al menos una pareja de unión específica, tal como anticuerpos, aptámeros, fagos, proteínas de fago recombinante, o cualquier medio equivalente, que permita la captura específica de las bacterias diana.

Estas últimas pueden colorearse simultáneamente a su crecimiento gracias al sistema de revelación contenido en el medio de cultivo.

25 Según un ejemplo particular, el sistema de revelación se basa en la reducción del TTC por los microorganismos. Simultáneamente al crecimiento, el TTC (incolore en su forma no reducida) se internaliza por dichos microorganismos, y después se reduce por estos últimos en trifenil-formazan (rojo) coloreando así dichos microorganismos de rojo y permitiendo entonces su revelación sobre el soporte.

30 El procedimiento de detección directa y en tiempo real de microorganismos en una muestra alimentaria, durante el periodo de incubación, se efectúa por lectura óptica de un soporte de captura sensibilizado, de manera automatizada o no. La incubación se puede realizar a unas temperaturas comprendidas entre 25 y 44°C durante de 6 a 48h.

35 Asimismo, una vez que se ha capturado de manera efectiva una cierta cantidad de microorganismos diana coloreados (el caso de una muestra positiva), se produce un cambio de las propiedades ópticas del soporte por aparición de una coloración roja sobre este (es decir, transducción de la señal biológica). Esta coloración del soporte de captura es entonces detectable a simple vista o medible mediante la utilización de un autómata de lectura tal como una cámara. El soporte de captura se representa esquemáticamente en la figura 10, después del análisis cuyo resultado es positivo. Como se puede observar, la zona 641 aparece coloreada debido a la fijación de los microorganismos diana sobre las parejas de unión específicas. La zona 642 que tiene la función de control negativo sigue siendo, por su parte, del color inicial del soporte de captura.

45 Para facilitar la lectura, es preferible que el soporte de captura sensibilizado no esté ya en contacto con el medio de cultivo. Para ese fin, se puede considerar, por ejemplo, inclinar la bolsa de homogeneización 10, esto está bien representado en la figura 8. Como se ha explicado anteriormente, la lectura se puede realizar en punto final, de manera discontinua o en tiempo real.

50 Según el procedimiento según la invención, el soporte de captura está constituido por unas partículas sensibilizadas, a saber que llevan una pareja de unión específica o no específica del o de los microorganismos a detectar. La detección se pone entonces preferiblemente en evidencia por la aparición de una aglutinación en tiempo real de las partículas sensibilizadas, por medio de los microorganismos diana unidos a estas últimas, durante el periodo de incubación. Tal modo de realización se describe en el documento WO-A-2009/122069.

55 Según un modo de realización particular, las partículas sensibilizadas pueden ser unas partículas magnéticas. Este modo de realización consiste en detectar directamente, mediante la aglutinación de partículas magnéticas sensibilizadas, la presencia del microorganismo diana (por ejemplo *E. coli* O157:H7) en una muestra alimentaria durante el enriquecimiento. La detección se efectúa durante el periodo de incubación sumergiendo las partículas magnéticas sensibilizadas con una pareja de unión específica (es decir, proteína de fago recombinante anti-*E. coli* O157:H7) en el contenedor cerrado que contiene la muestra alimentaria diluida en el medio de cultivo.

60 En esta alternativa, puede ser ventajoso utilizar un contenedor secundario, de tipo tubo, en el interior del contenedor principal (bolsa de homogeneización) a fin de mejorar la puesta en evidencia de la aglutinación de partículas sensibilizadas. Como se puede observar en la figura 11, la bolsa de homogeneización 10 contiene además del medio de cultivo 62 y de la muestra 60, un tubo 66. Este tubo 66 está en comunicación fluidica con el medio de cultivo 62 contenido en la bolsa de homogeneización 10 por medio de un conducto 68. Una fracción del medio de cultivo 62 que contiene la muestra alimentaria puede entonces transferirse en el tubo 66, en el que se realiza la detección. Tal transferencia puede realizarse especialmente por cambios de temperatura, basados en la ley de los gases perfectos

(PV=nRT). Tal procedimiento se describe en el documento WO-A-2004/092401.

Debido a la utilización de partículas magnéticas, la lectura en el contenedor secundario que contiene el medio de reacción al final del periodo de incubación se hará con la ayuda de un lector magnético.

La señal magnética puede amplificarse gracias a la utilización previa de un campo magnético (mediante un imán) que concentra la aglutinación en el centro de la zona de lectura.

La aplicación de un campo magnético puede también mejorar el límite de detección, cuando este fenómeno provoca la formación de una aglutinación, tras el acercamiento de las partículas magnéticas que han capturado los microorganismos. En efecto, si la concentración de microorganismos es insuficiente para provocar una aglutinación pasiva, el hecho de acercar entre sí las partículas magnéticas, de las cuales algunas habrán capturado previamente los microorganismos, forzará la formación de una aglutinación. Además, la repetición de esta secuencia (es decir, imantación y resuspensión) puede también amplificar el fenómeno de captura y de formación de una aglutinación y, por lo tanto, amplificar la sensibilidad del análisis.

Los ejemplos presentados a continuación tienen como objetivo presentar diferentes modos de realización del procedimiento según la invención y los resultados obtenidos. No son de ninguna manera limitativos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de los electrodos de análisis del biosensor electroquímico

Reactivos

El perclorato de litio (LiClO₄), el cloruro de sodio (NaCl), el hidróxido de sodio (NaOH), el hexacianoferrato de potasio (III) (K₃Fe (CN)₆), el hexacianoferrato de potasio (II) trihidratado (K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O), el Tween 20, el tampón fosfato (BPS), la albúmina de suero bovino (ASB), el tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), el ácido maleico, el ADN de Salmón y el Denhardt 50X provienen de la compañía Sigma-Aldrich.

El tampón de lavado, pH 7,2, es el PBS 0,01M, NaCl 0,5M y el 0,05% de Tween.

El tampón de hibridación es el PBS 0,01M, NaCl 0,5M, Denhardt 2X y el ADN de salmón a 10 µg/ml.

El tampón de injerto de la pareja de unión es el tampón TRIS-MALEATE BSA pH 6,2 constituido de 24,23 g/l de TRIS, de 23,2 g/l de ácido maleico, de 6 g/l de hidróxido de sodio y de 5 g/l de BSA.

El 3-(2-hidroxi)pirrol o PyOH y el 3-(ftalimida etanoato)pirrol o PyNHP se proporcionan por EZUS Lyon.

Unos oligonucleótidos sintéticos que comprenden 20 nucleótidos y que llevan un grupo amino en el extremo 5' se fijan de manera covalente por sustitución de los grupos NHP.

El monómero funcional es el siguiente: Pyr-^{5'}TTTTTTTTTTGAATCCTCAGTTTTTCAACG^{3'}.

El oligonucleótido complementario lleva un grupo biotina en el extremo 5'. Su secuencia es la siguiente: ^{5'}CGTTGAAAAACTGAGGATTC^{3'}.

Biosensor y material de detección electroquímica:

Las mediciones de detección electroquímica se realizan con un potenciostato BioLogic de Sciences Instruments, controlado por ordenador.

El sensor utilizado procede de la tecnología de los circuitos impresos (PCB). El depósito de oro sobre los electrodos es un depósito galvánico por electrolisis a partir de un baño a base de oro. Los electrodos se componen de una multicapa epoxi, cobre, níquel y oro.

Preparación de los electrodos:

Para el lavado de los electrodos, la zona de análisis de los sensores se sumerge en una solución de agua destilada/etanol 1:1, durante un minuto en un baño de ultrasonidos.

Después del lavado, los sensores se limpian y se activan electroquímicamente. Para ello, se deposita una gota de 30 µl de NaOH 0,2 M en agua destilada sobre la zona de análisis del sensor, a fin de humedecer la totalidad de los electrodos. El sensor se conecta a un potenciostato y se imponen varios ciclos de salto de potencial en oxidación y en reducción por cronoamperometría. El objetivo de esta etapa es generar unas burbujas de oxígeno en la interfaz con los electrodos a fin de suprimir cualquier contaminante orgánico y/o inorgánico. El sensor se aclara después con agua

destilada.

5 La superficie de los electrodos de trabajo se modifica por electrodeposición de copolímero. Así, todos los electrodos se recubren con una gota de solución de electropolimerización, 100 mM de PyOH y 25 μ M de PyODN (proporción de concentración 1/4000) y 0,5 M LiClO₄. La reacción se electroconduce después por aplicación de un potencial fijo de 0,8V/pseudo referencia oro, impuesto por cronoamperometría. La polimerización se interrumpe una vez que se alcanza la carga impuesta de 11 mC/cm². El copolímero se forma simultáneamente sobre todos los electrodos de trabajo. Los electrodos se aclaran después con agua destilada.

10 La etapa siguiente consiste en la hibridación. El sensor se recubre con una gota de 30 μ l de solución tampón en presencia de 100 nM de ODN diana biotinilado. La hibridación se realiza a 37°C durante 30 minutos. Después de una etapa de lavado con tampón PBS, el sensor se sumerge en una solución de estreptavidina 100 μ g/ml en el tampón PBS durante 15 minutos con agitación. La molécula antiligando se fija después poniendo el sensor en contacto con una solución de molécula antiligando a 1 μ g/ml en el tampón TRIS-maleato BSA.

15 En los ejemplos siguientes, la molécula antiligando es una proteína recombinante de fago para la detección de *E. coli* O157 o un fragmento Fab' para la detección de *Listeria spp.*

Ejemplo 2: Detección de *E. coli* O157:H7 en una muestra alimentaria

20 Se incuba con una muestra alimentaria un biosensor funcionalizado con unas proteínas recombinantes de fago específico de *E. coli* O157, tal como se ha descrito anteriormente y solidarizado a una bolsa de homogeneización.

25 Se incuban dos bolsas que comprenden los biosensores con unas preparaciones de enriquecimientos positivos. Se incuban dos bolsas que comprenden los biosensores con las preparaciones de enriquecimientos negativos, y se incuban dos bolsas que comprenden los biosensores con una preparación de enriquecimiento no contaminada a fin de medir el ruido de fondo de la matriz alimentaria.

30 Preparación de enriquecimientos positivos

Se colocan 25 g de carne cruda que tienen un mínimo un 5% de materias grasas de manera aspéptica en la bolsa Stomacher[®] con filtro y se ponen en contacto con *E. coli* O157:H7 ATCC 43888. La bolsa se coloca 24 horas a 2-8°C para estresar la cepa.

35 Después, se añaden a la muestra 225 ml de agua peptonada tamponada (ref. 42043 bioMérieux) precalentados durante 24 horas a 41,5°C y 5 mM de sonda redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.

40 Se ha verificado previamente el crecimiento de las bacterias *E. coli* O157:H7 en presencia de 5 mM de sonda redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. Se ha confirmado que la presencia de esta sonda redox no ralentizaba el crecimiento bacteriano dentro de un medio de cultivo.

Después de la homogeneización de la suspensión, se coloca un soporte de captura funcionalizado en la bolsa Stomacher[®].

45 Este protocolo se repite con el fin de probar dos suspensiones positivas mediante dos bolsas que comprenden un soporte funcionalizado.

Un recuento sobre caja de Petri, a partir de las dos suspensiones positivas, ha permitido evaluar, antes de la incubación en la bolsa Stomacher[®], una concentración media en *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 a 0,92 UFC/g de carne cruda.

50 La preparación se incuba entonces a 41,5°C durante 3 horas.

Preparación de los enriquecimientos negativos

55 Control negativo: a partir del mismo número de lote de carne cruda, se colocan 25 g de manera aspéptica en una bolsa Stomacher[®] con filtro y se pone en contacto con *Bacillus cereus* ATCC 27522. La bolsa se coloca durante 24 horas a 2-8°C para estresar la cepa.

60 Después, se añaden a la muestra 225 ml de agua peptonada tamponada (ref. 42043 bioMérieux) precalentados 24 horas a 41,5°C y 5 mM de sonda redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.

Después de la homogeneización de la suspensión, se coloca en la bolsa un soporte de captura funcionalizado.

65 Este protocolo se repite a fin de probar dos suspensiones negativas mediante dos bolsas que comprenden un soporte funcionalizado.

En las dos suspensiones, el porcentaje de contaminación por *Bacillus cereus* ATCC 27522, antes de la incubación en la bolsa Stomacher®, se evalúa a 1,32 UFC/g de carne cruda (medición teórica).

5 La preparación se incuba entonces a 41,5°C durante 3 horas.

Medición del ruido de fondo generado por la matriz: se repite el mismo protocolo sin bacterias. La preparación se incuba a 41,5°C durante 6 horas.

10 El objetivo de este ensayo es verificar si es posible detectar *E. coli* O157:H7 después de 3 horas de incubación/enriquecimiento.

Resultados obtenidos:

15 Para cada bolsa, la medición de impedancia se realiza directamente, sin etapa de lavado del biosensor.

Los gráficos Nyquist (-Im(z) frente Re(z)) obtenidos a 200 mV en una escala de frecuencia comprendida entre 1 Hz a 100 kHz se agrupan en la figura 5.

20 El espectro de impedancia electroquímica obtenido después de 6 horas de incubación de la preparación de carne cruda en la bolsa Stomacher® sin contaminación y el obtenido después de 3 horas de incubación de la preparación de carne cruda con contaminación negativa muestran la misma resistencia de transferencia de electrones R_{ct} (diámetro de los semi-círculos), los valores son respectivamente iguales a 116 y 115 kΩ.

25 La resistencia a la transferencia de electrones se atribuye, por lo tanto, al ruido de fondo de la matriz, que es idéntico a la resistencia a la transferencia de electrones durante crecimiento de las bacterias no diana.

30 Después de 3 horas de enriquecimiento de la preparación de carne cruda con contaminación positiva, por *E. coli* O157:H7 (0,92 UFC/g de carne cruda), el valor de resistencia a la transferencia del electrón es de 719 kΩ, es decir aproximadamente seis veces superior a la obtenida con la contaminación negativa y permite, por lo tanto, una detección clara de *E. coli* O157:H7.

35 El valor R_{ct} medio obtenido con la totalidad de las bolsas de homogeneización, los valores de desviación estándar y de coeficiente de variación se agrupan en la tabla 1 siguiente. Los valores indicados son los valores brutos de resistencia de carga que corresponden al diámetro del semicírculo de la señal de impedancia.

	Ruido de fondo matriz (sin contaminación)	Contaminación negativa <i>B. cereus</i> (1,32 CFU/g)	Contaminación positiva <i>E. coli</i> (0,92 UFC/g)
Media R_{ct} (kΩ)	109	90	708
Desviación estándar	9	8	25
Coefficiente variación (%)	8	9	4
Número de mediciones	16	7	16

Tabla 1

40 Ejemplo 3: Detección de *Listeria innocua* en una muestra alimentaria

Se incuba con una muestra alimentaria un biosensor funcionalizado con unos fragmentos Fab' específicos de *Listeria*, tal como se ha descrito anteriormente y solidarizado con una bolsa de homogeneización.

45 Una bolsa que comprende los biosensores se incuba con una preparación de enriquecimiento positivo. Una bolsa que comprende los biosensores se incuba con una preparación de enriquecimiento negativo.

Preparación del enriquecimiento positivo

50 Se colocan 25 g de carne cruda que tienen como mínimo un 5% de materias grasas de manera aséptica en una bolsa Stomacher® con filtro y se pone en contacto con *Listeria innocua* ATCC 33090. La bolsa se coloca durante 22 horas a 2-8°C para estresar la bacteria.

55 Después, se añaden a la muestra 225 ml de caldo *Listeria* XPress (ref. 42626 bioMérieux) precalentados 18 horas a 30°C y 5 mM de sonda redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

Se verificó previamente el crecimiento de las bacterias *Listeria innocua* en presencia de 5 mM de sonda redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Se ha confirmado así que la presencia de esta sonda redox no inhibía el crecimiento bacteriano dentro de un medio de cultivo.

5 Después de la homogeneización de la suspensión, dos soportes de captura funcionalizados se colocan en la bolsa Stomacher®.

Un recuento sobre caja de Petri ha permitido evaluar la concentración en *Listeria innocua* ATCC 33090, antes de la incubación en la bolsa Stomacher® a 0,48 UFC/g de carne cruda.

10

La preparación se incuba entonces a 30°C durante 6 horas.

Preparación del enriquecimiento negativo

15 Control negativo: a partir del mismo número de lote de carne cruda, se colocan 25 g de manera aséptica en una bolsa Stomacher® con filtro y se ponen en contacto con *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. La bolsa se coloca durante 22 horas a 2-8°C.

20 Después, se añaden a la muestra 225 ml de caldo *Listeria* XPress (ref. 42626 bioMérieux) precalentados 18 horas a 30°C y 5 mM de sonda redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

Después de la homogeneización de la suspensión, se colocan dos soportes de captura en la bolsa Stomacher®. La concentración en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P es de $4 \cdot 10^7$ UFC/g de carne cruda (medición teórica), antes de la incubación en la bolsa Stomacher®.

25

La preparación se incuba entonces a 30°C durante 6 horas.

El objetivo de este ensayo es verificar si es posible detectar las bacterias del género *Listeria* después de 6 horas de incubación/enriquecimiento.

30

Resultados obtenidos:

Para cada bolsa, se realiza la medición de impedancia directamente, sin etapa de lavado del biosensor.

35 Los gráficos Nyquist (-Im(z) frente a Re(z)) obtenidos a 200 mV en una escala de frecuencia comprendida entre 1 Hz y 100 kHz se agrupan en la figura 6.

El espectro de impedancia electroquímica obtenido después de 6 horas de incubación de la preparación de carne cruda en la bolsa de homogeneización con contaminación negativa (*Staphylococcus aureus* a $4 \cdot 10^7$ CFU/g) (figura 6 línea discontinua) muestra un valor de resistencia a la transferencia de electrón de 13 kΩ.

40

Después de 6 horas de enriquecimiento de la preparación de carne cruda con contaminación positiva, por *Listeria innocua* ATCC 33090 (0,48 UFC/g de carne cruda antes de la incubación) (figura 6 línea continua), el valor de resistencia a la transferencia de electrón es de 45 kΩ, es decir aproximadamente tres veces superior al obtenido con la contaminación negativa.

45

Este resultado muestra claramente que es posible detectar la presencia de bacterias *Listeria innocua* presentes en una muestra alimentaria con unos fragmentos Fab' específicos fijados sobre un biosensor electroquímico en contacto con un medio de enriquecimiento que contiene dicha muestra sin etapa de lavado del sensor, ni amplificación de la señal.

50

El valor R_{ct} medio obtenido con la totalidad de las bolsas de homogeneización, los valores de desviación estándar y de coeficiente de variación, se agrupan en la tabla 2 siguiente. Los valores indicados son los valores brutos de resistencia de carga que corresponde al diámetro del semicírculo de la señal de impedancia.

55

	Contaminación negativa <i>S. aureus</i> ($4 \cdot 10^7$ CFU/g)	Contaminación positiva <i>L. innocua</i> (0,48 UFC/g)
Media R_{ct} (kΩ)	15	45
Desviación estándar	1	8
Coeficiente variación (%)	5	17
Número de mediciones	16	12

Tabla 2

Ejemplo 4: Elaboración de un soporte de captura sensibilizado con al menos una pareja de unión específica del microorganismo diana con fines de detección óptica

- 5 Un soporte de captura, de poliestireno irradiado, comercializado por la compañía Nunc/Thermo Scientific (Cat. nº 472230) y representado en las figuras 9 y 10.

La sensibilización del soporte de captura se realiza en seis etapas, de la siguiente manera:

- 10 1) el soporte de poliestireno se sumerge a 37°C durante una noche en una solución de ASB (Albúmina de Suero bovino)-biotinilada a 5 µg/ml en tampón carbonato pH 9,6;
- 2) el soporte se aclara después con un tampón PBS durante algunos segundos;
- 15 3) después del aclarado, el soporte se sumerge a 37°C durante dos horas en una solución de estreptavidina a 10 µg/ml en tampón fosfato a pH 7,2;
- 4) el soporte se aclara después con un tampón carbonato a pH 9,6 durante algunos segundos;
- 20 5) el soporte se sumerge entonces durante dos horas a 37°C en una solución de parejas de unión específicas (1 µg/ml a 40 µg/ml) en tampón carbonato a pH 9,6;
- 6) el soporte es finalmente pasivo en una solución de ASB en tampón carbonato a pH 9,6, durante dos horas a 37°C.
- 25 El soporte sensibilizado así elaborado se puede utilizar para la detección óptica de los microorganismos o conservarse a 2-8°C para una utilización ulterior.

Ejemplo 5: Detección óptica de *Escherichia coli* O157:H7 en una muestra alimentaria mediante la utilización de un soporte sensibilizado

- 30 El objetivo de este experimento es detectar directamente, mediante la utilización de un soporte sensibilizado, tal como se ha descrito anteriormente y se representa en la figura 8, la presencia de la bacteria *E. coli* O157:H7 en una muestra alimentaria durante el enriquecimiento.
- 35 Como se detalla a continuación, la detección se efectúa durante el periodo de incubación sumergiendo el soporte de captura sensibilizado con una proteína de fago recombinante anti-*E. coli* O157:H7 en una bolsa de homogeneización que contiene la muestra alimentaria, diluida al 1/10 en el medio de reacción.

Protocolo:

- 40 Etapas 1: Resuspensión de las muestras en el medio de reacción

Se preparan de la siguiente manera cuatro muestras:

- 45 * Muestra A: En una bolsa de homogeneización, 25 g de carne picada contaminados por 5 unidades que forman colonias (UFC) de *E. coli* O157:H7 se resuspenden en 225 ml de EPT (bioMérieux, Ref. 42043) suplementados por 0,01 g/l de vancomicina (Sigma, Cat. nº 75423) y 0,3 g/l de TTC (bioMérieux, Ref. 04568088);
- 50 * Muestra B: En una bolsa de homogeneización, 25 g de carne picada no contaminados por *E. coli* O157:H7 se resuspenden en 225 ml de EPT suplementados por 0,01 g/l de vancomicina y 0,3 g/l de TTC;
- * Muestra C: En una bolsa de homogeneización, 375 g de carne picada contaminados por 5 UFC de *E. coli* O157:H7 se resuspenden en 3375 ml de EPT suplementados por 0,01 g/l de vancomicina y 0,3 g/l de TTC;
- 55 * Muestra D: En una bolsa de homogeneización, 375 g de carne picada no contaminados por *E. coli* O157:H7 se resuspenden en 3375 ml de EPT suplementados por 0,01 g/l de vancomicina y 0,3 g/l de TTC.

Para cada muestra, los análisis se llevan a cabo por triplicado.

- 60 Etapas 2: Inmersión de los soportes sensibilizados en las bolsas de homogeneización con incubación

El soporte de captura sensibilizado se dispone en cada bolsa Stomacher (muestras A, B, C y D) como se describe a continuación. Las bolsas de homogeneización se cierran después con la ayuda de un pasador de cierre y se incuban en un horno a 41,5°C durante 16-24h.

- 65 Etapas 3: Lectura de los soportes de captura al final del periodo de incubación

Al final de la incubación (20h a 41,5°C) y después de la reducción no específica del TTC por el conjunto de las bacterias presentes en la muestra (es decir, que pertenecen a la flora anexa y la flora diana), el medio de reacción se colorea de rojo. Asimismo, con el fin de poder observar el soporte de captura que revela la positividad o negatividad de la muestra analizada, las bolsas de homogeneización se inclinan a fin de aislar dicho soporte de captura del medio de reacción.

Conforme al plano experimental, las muestras B y D son positivas, mientras que las muestras A y C son, por su parte, negativas. El análisis de estas mismas muestras por el método VIDAS® ECPT, comercializado por la solicitante (ref. 30122) ha llevado a unos resultados análogos, confirmando así los resultados obtenidos mediante la lectura óptica del soporte de captura sensibilizado.

Finalmente, los niveles objetivo alcanzados después de 20h de incubación son del orden de 5,5 log₁₀ UFC/ml para la muestra B y 3,5 log₁₀ UFC/ml para la muestra D.

Ejemplo 6: Detección óptica de *Listeria spp* en unas muestras medioambientales mediante la utilización de un soporte sensibilizado

El objetivo de este experimento es detectar directamente, mediante la utilización de un soporte sensibilizado, la presencia de cepas bacterianas que pertenecen al género *Listeria* en unas muestras medioambientales durante el enriquecimiento.

Como se detalla a continuación, la detección se efectúa durante el periodo de incubación sumergiendo un soporte de captura tal como se describe en la figura 10, sensibilizado con tres proteínas de fago recombinante anti-*Listeria spp*. en un contenedor cerrado que contiene la muestra diluido en el medio de reacción.

Protocolo:

Etapa 1: resuspensión de las muestras en el medio de reacción

El conjunto de las muestras medioambientales se prepara como en el ejemplo detallado a continuación;

Unas esponjas (8 cm x 3 cm) que han servido para extracciones de las superficies se dividen en dos mitades, y se tratan de la siguiente manera:

Muestra 1: En un contenedor (es decir, pastillero), la primera ½ esponja se contamina artificialmente mediante 5 UFC de una cepa que pertenece al género *Listeria* y se resuspende en 45 ml de medio LX (bioMérieux, Ref. 42635) suplementados por 0,1 g/l de TTC (bioMérieux, Ref. 04568088);

Muestra 2: En un segundo contenedor (es decir, pastillero), la otra mitad no contaminada por una cepa que pertenece al género *Listeria* se resuspende en 45 ml de medio LX (bioMérieux, Ref. 42635) suplementados por 0,1 g/l de TTC (bioMérieux, Ref. 04568088).

La relación entre las muestras y las cepas inoculadas artificialmente se presenta en la tabla 3 siguiente:

nº Muestra	Cepa inoculada
Muestra A1	<i>L. monocytogenes 4b ATCC 19115</i>
Muestra A2	NA
Muestra B1	<i>L. seeligeri NSB 22460</i>
Muestra B2	NA
Muestra C1	<i>L. welshimeri 6a</i>
Muestra C2	NA

Tabla 3

Etapa 2: Inmersión del soporte sensibilizado en el contenedor (pastillero) antes de la incubación

Un soporte sensibilizado, tal como se describe en las figuras 9 y 10, se dispone en cada pastillero. Para ello, se realiza un agujero en la tapa del pastillero de manera que el soporte de captura 64 sensibilizado pueda introducirse en él con fuerza, hasta que la zona de análisis (zonas 641 y 642) esté completamente sumergida en el medio de cultivo. Los pastilleros se vuelven a cerrar después con su tapa y se incuban en un horno a 30°C durante 24-48h.

Etapa 3: Lectura de los soportes de captura al final del periodo de incubación

Al final de la incubación (24-48h a 30°C) y después de la reducción no específica del TTC por el conjunto de las

bacterias presentes en la muestra (es decir, que pertenecen a la flora anexa y a la flora diana), el medio de cultivo se colorea de rojo. Asimismo, con el fin de poder observar el soporte de sensor sensibilizado que revela la positividad o negatividad de la muestra analizada, las bolsas de homogeneización se inclinan a fin de aislar este último del medio de reacción. Cada muestra se analiza también mediante el método VIDAS® LIS (Ref. 30700).

5

Los resultados obtenidos se enumeran en la tabla 4 siguiente:

nº Muestra	Cepa inoculada	Resultado biosensor óptico	Resultado VIDAS LIS
Muestra A1	<i>L. monocytogenes 4b ATCC 19115</i>	+	+
Muestra A2	NA	-	-
Muestra B1	<i>L. seeligeri NSB 22460</i>	+	+
Muestra B2	NA	-	-
Muestra C1	<i>L. welshimeri 6a</i>	+	+
Muestra C2	NA	-	-

Tabla 4

10

Para el soporte de captura sensibilizado, una coloración roja de la zona 641 y una ausencia de coloración de la zona 642 del soporte de captura pone de relieve la positividad de la muestra (véase la figura 10).

15

Conforme al plan experimental, las muestras 1 son positivas, mientras que las muestras 2 frente a negativas son negativas. El análisis de estas mismas muestras por el método VIDAS LIS ha llevado a resultados análogos, confirmando así los resultados obtenidos mediante la lectura óptica de un soporte de captura sensibilizado.

20

Ejemplo 7: Elaboración de las partículas funcionalizadas (conjugadas) por al menos una pareja de unión específica del microorganismo diana

Para este ejemplo, se elaboran dos tipos de conjugados a partir de partículas de látex de un diámetro de 400 nm.

25

* Preparación por adsorción de la pareja de unión específica (proteína de fago recombinante anti-*E. coli* O157:H7) siguiendo las etapas de la siguiente manera:

1. lavado de las partículas de látex (Plain Hidy blue, Polymer lab) en agua VERSOL por centrifugación;

30

2. adsorción de las parejas de unión específicas a 150 µg/ml en tampón fosfato pH 7 en presencia de las partículas de látex a un porcentaje de sólido del 0,5% durante 3 horas a temperatura ambiente y agitación de rueda.

Los rendimientos de adsorción son superiores al 80%, por lo tanto no es necesario efectuar un lavado de las partículas de látex después de la adsorción.

35

* preparación por acoplamiento de la pareja de unión específica (proteína recombinante de fago anti O127) siguiendo las etapas de la siguiente manera:

1. lavado de las partículas de látex (Carboxylique Hidy blue, Polymer lab) en agua Versol por centrifugación;

40

2. acoplamiento al hidrocloreto de etil-(N',N'-dimetilamino)propilcarbodiimida (EDC) de la estreptavidina a 125 µg/ml en tampón fosfato 20 mM pH 7 en presencia de las partículas de látex a un porcentaje de sólido del 0,5% por agitación con termomezclador a 37°C y 700 rpm durante 3 horas;

45

3. la estreptavidina no acoplada se elimina por centrifugación de 20 minutos a 500 g y el residuo se recoge en tampón Tris 20 mM pH 7;

4. adición de la pareja de unión específica biotinilada (proteína de fago recombinante anti-*E. coli* O157:H7 biotinilada) a 150 µg/ml e incubación durante 3 horas a temperatura ambiente y agitación de rueda;

50

5. eliminación del exceso de pareja de unión por centrifugación durante 10 minutos a 7000 g y recogida en tampón Tris 20 mM pH 7.

Ejemplo 8: Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en unas muestras alimentarias mediante la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas en medio líquido

55

El objetivo de este experimento es detectar directamente, mediante la aglutinación de partículas de látex azules sensibilizadas, tales como se describen en el ejemplo anterior, la presencia de la bacteria diana *E. coli* O157:H7 en una muestra alimentaria durante el enriquecimiento.

Tal como se detalla a continuación, la detección se efectúa durante el periodo de incubación sumergiendo las partículas de látex azules sensibilizadas con una proteína de fago recombinante anti-*E. coli* O157:H7, en el contenedor cerrado que contiene la muestra alimentaria diluida en el medio de enriquecimiento.

5 Protocolo:

Etapa 1: resuspensión/dilución de las muestras en el medio de enriquecimiento

10 Se preparan seis muestras de la siguiente manera:

Muestra A1: En una bolsa de homogeneización, 25 ml de leche pasteurizada contaminados por 5 UFC de *E. coli* O157:H7 se diluyen en 225 ml de EPT (bioMérieux, ref. 42043);

15 Muestra A2: En una bolsa de homogeneización, 25 ml de leche pasteurizada no contaminados por *E. coli* O157:H7 se diluyen en 225 ml de EPT;

Muestra B1: En una bolsa de homogeneización, 25 g de salmón contaminados por 5 UFC de *E. coli* O157:H7 se resuspenden en 225 ml de EPT;

20 Muestra B2: En una bolsa de homogeneización, 25 g de salmón no contaminados por *E. coli* O157:H7 se resuspenden en 225 ml de EPT;

25 Muestra C1: En una bolsa de homogeneización, 25 g de ensalada contaminados por 5 UFC de *E. coli* O157:H7 se resuspenden en 225 ml de EPT;

Muestra C2: En una bolsa de homogeneización, 25 g de ensalada no contaminados por *E. coli* O157:H7 se resuspenden en 225 ml de EPT;

30 Para cada muestra, se efectúan tres repeticiones.

Etapa 2: Inserción del tubo que contiene el medio de reacción en la bolsa de homogeneización antes de la incubación

35 Conforme a la figura 11, un tubo que contiene el medio de reacción se añade después en la bolsa de homogeneización. El medio de reacción está compuesto de 100 µl de partículas de látex azules sensibilizadas y de 1,4 ml de EPT suplementado con 10 mg/l de vancomicina.

40 Las bolsas de homogeneización se vuelven a cerrar después con la ayuda de un pasador de cierre y se colocan en un horno programable para una incubación en tres fases. En efecto, la transferencia de un alícuota de muestra (0,5 ml) de la bolsa de homogeneización hacia el tubo que contiene el medio de reacción, se realiza según el procedimiento descrito en el documento WO-A-2004/092401, basado en la ley de los gases perfectos ($pV = nRT$).

El periodo de incubación se declina de la siguiente manera:

45 Fase 1: 16h a 41,5°C; enriquecimiento de los 25 g de muestra diluidos en EPT,

Fase 2: 1h a 30°C; transferencia de 0,5 ml de muestra en el tubo que contiene el medio de reacción,

50 Fase 3: 8h a 41,5°C; enriquecimiento del medio de reacción que contiene el alícuota de 0,5 ml.

Conforme al plano experimental, las muestras nº 1 se han determinado como positivas frente a negativas para las muestras nº 2. El análisis de estas mismas muestras mediante el método VIDAS ECPT ha llevado a unos resultados análogos, lo que confirma así los resultados obtenidos mediante la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas en medio líquido.

55

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de al menos un microorganismo presente en una muestra colocada en un contenedor cerrado, comprendiendo dicho método esencialmente las etapas siguientes:
- 5 a) poner en contacto en el contenedor dicha muestra con
- i. al menos un medio de cultivo,
- 10 ii. un sistema de revelación apto para permitir la detección
- iii. un soporte apto para capturar el o los microorganismos a detectar, estando dicho soporte constituido de partículas magnéticas sobre las cuales se fija al menos una pareja de unión específica del o de los microorganismos a detectar, seleccionándose dicha pareja de unión específica entre los anticuerpos, los fragmentos Fab, los fragmentos Fab', las
- 15 proteínas de fagos recombinantes o no, los fagos,
- b) cerrar el contenedor,
- c) colocar el contenedor en unas condiciones aptas para permitir el crecimiento del o de los microorganismos,
- 20 d) aplicar un campo magnético para acercar las partículas magnéticas.
- e) detectar en el interior de dicho contenedor cerrado, con la ayuda de un medio de detección, la presencia del o de los microorganismos fijados sobre el soporte de captura, realizándose la detección en tiempo real y poner en evidencia
- 25 por la aparición de una aglutinación en tiempo real de las partículas magnéticas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende una etapa intermedia c') que consiste en transferir todo o parte de la mezcla constituida por dicha muestra, el medio de cultivo, el soporte apto para capturar el o los microorganismos a detectar y, eventualmente, el sistema de revelación, desde el contenedor, denominado entonces
- 30 principal, hacia al menos un segundo contenedor denominado secundario.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende una etapa suplementaria f) que consiste en confirmar la detección del o de los microorganismos detectados.
- 35 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la etapa f) de confirmación se realiza con la ayuda de un medio de detección, idéntico o diferente del medio de detección utilizado para la etapa de detección.
5. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de detección se escoge del grupo que comprende: los medios de detección eléctricos, especialmente electroquímicos, los medios de detección
- 40 ópticos.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte de captura del o de los microorganismos constituye también el medio de detección.
- 45 7. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la aplicación del campo magnético se repite.
8. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el contenedor es una bolsa de homogeneización, un frasco, una botella, o un pastillero.
- 50 9. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de detección se conecta a un sistema de análisis de datos.
10. Procedimiento de detección según la reivindicación 9, en el que la conexión entre el soporte de captura o el medio
- 55 de detección y el dispositivo de análisis de datos es una conexión por cable o una conexión inalámbrica.

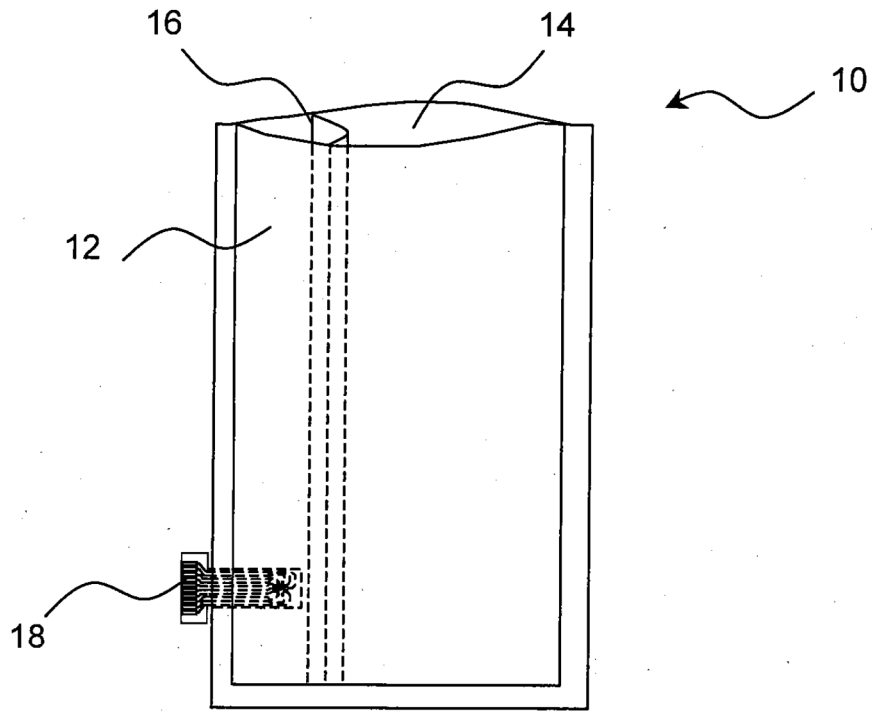


Fig. 1

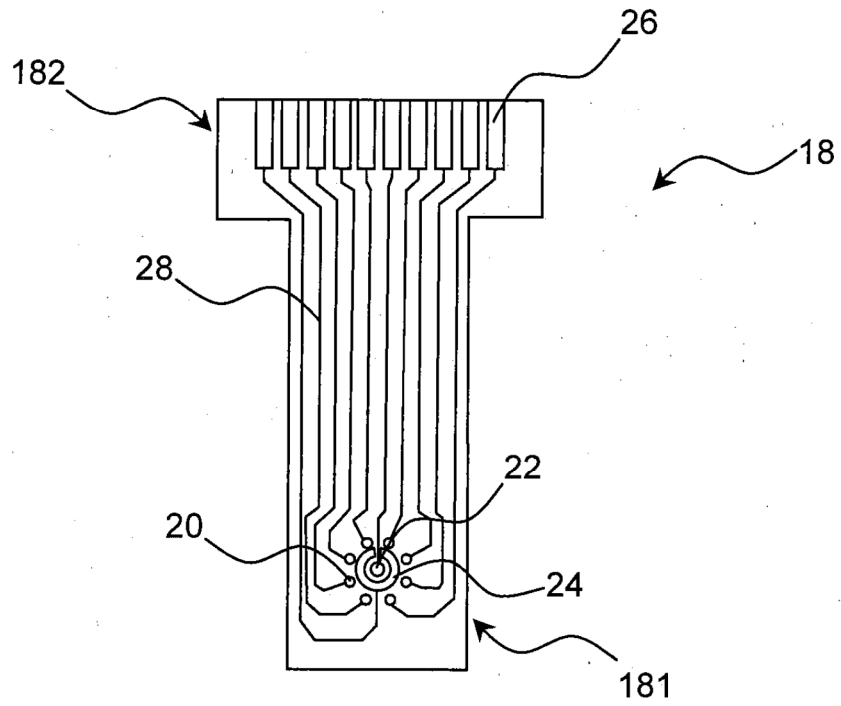
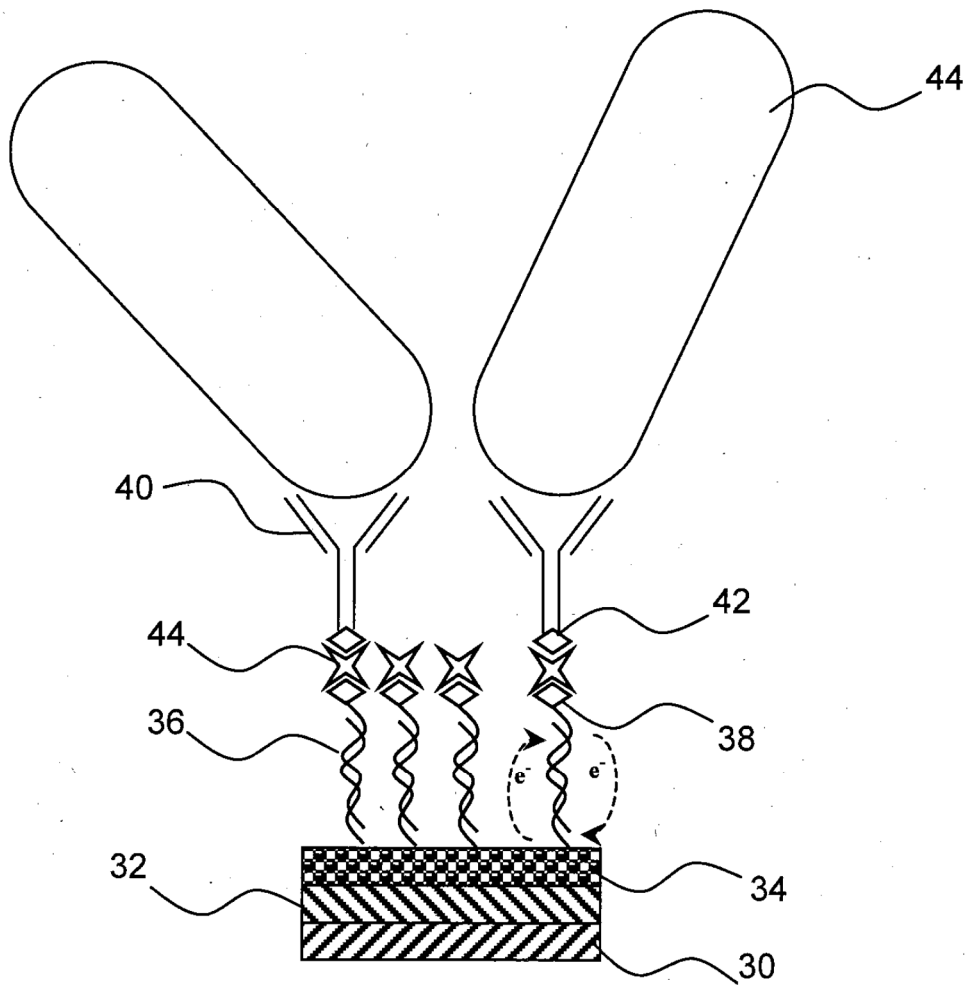
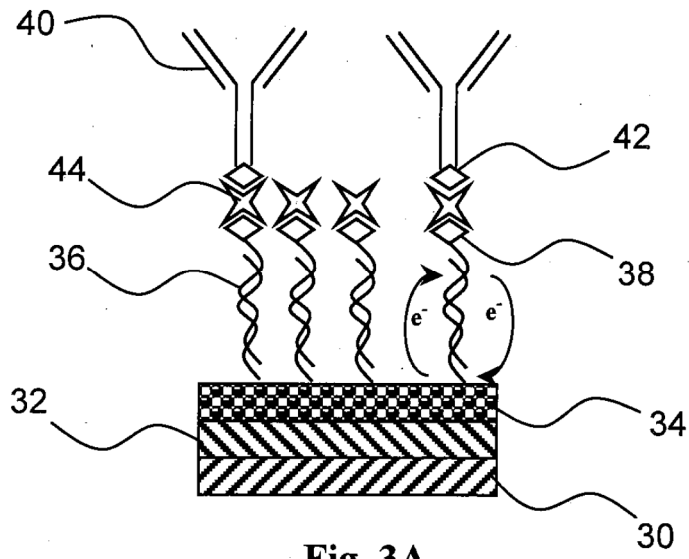


Fig. 2



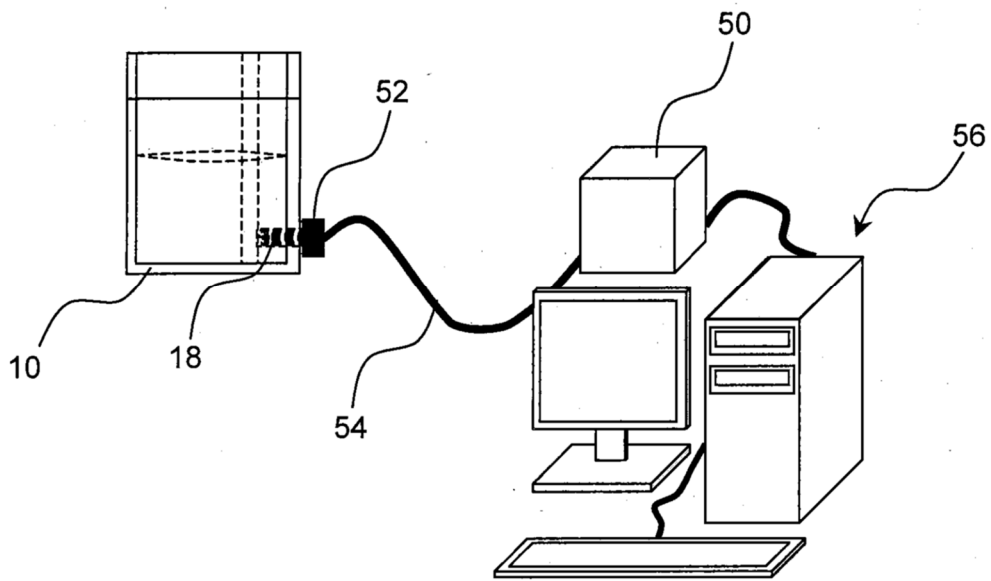


Fig. 4

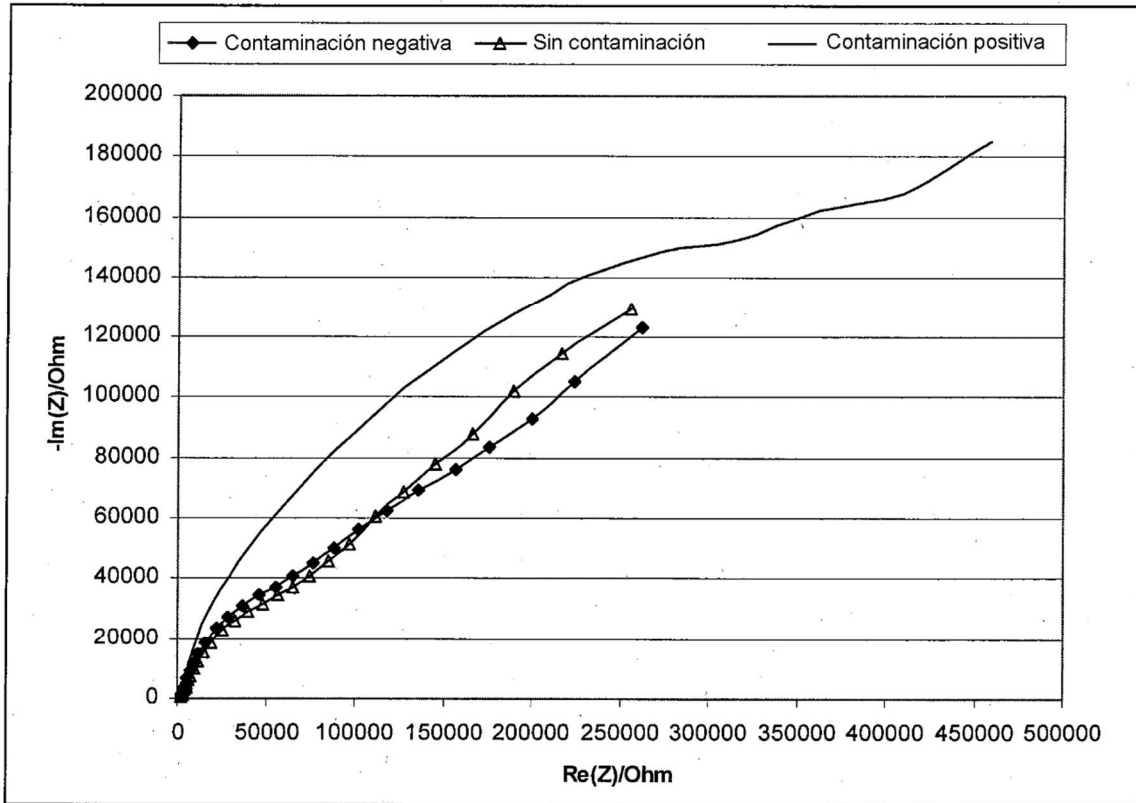


Fig. 5

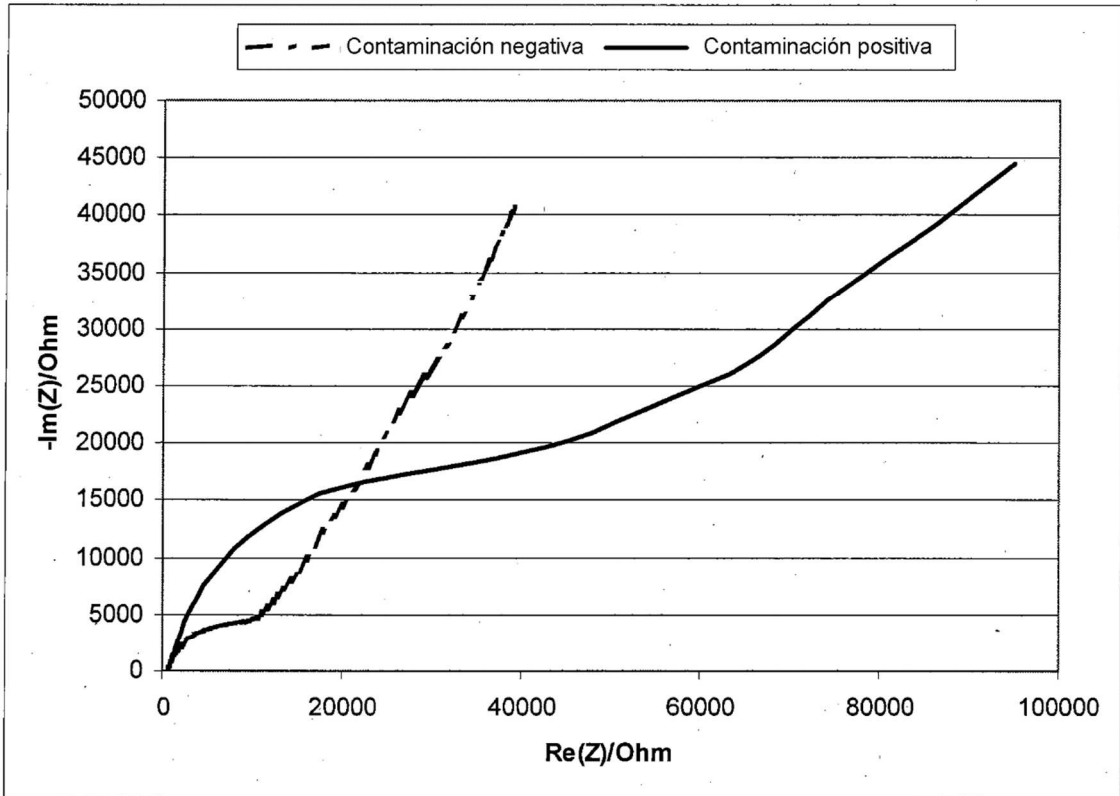


Fig. 6

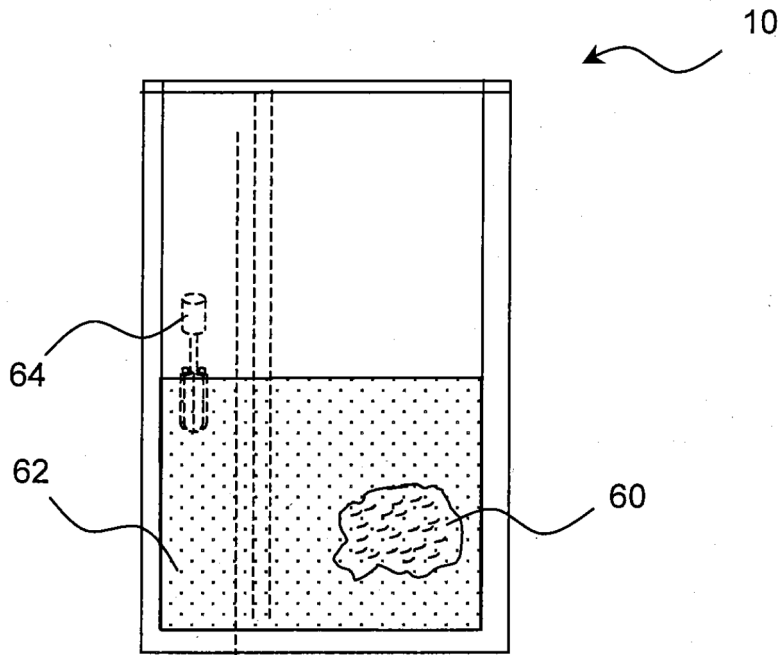


Fig. 7

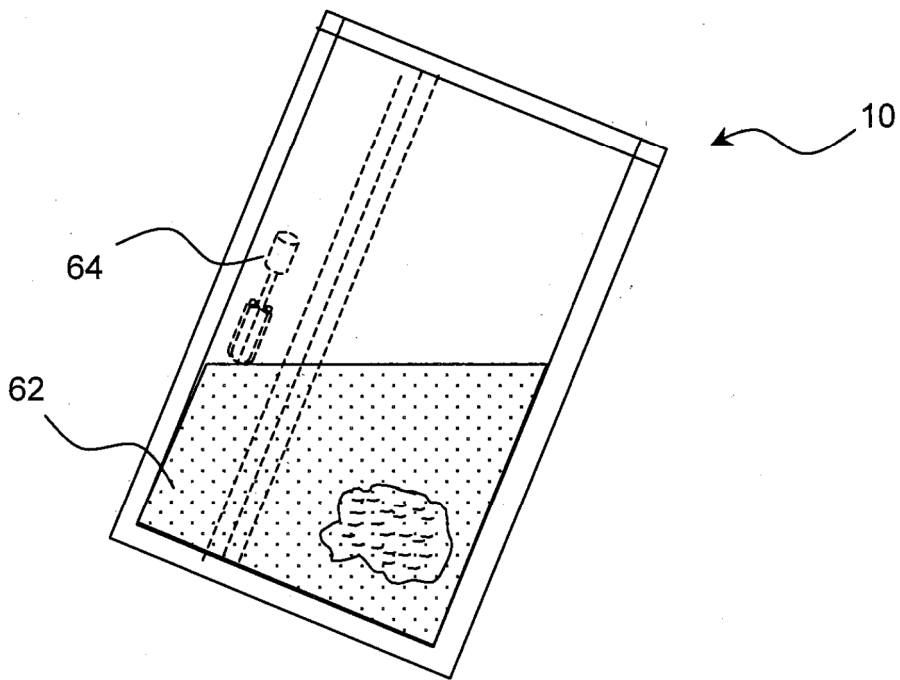


Fig. 8

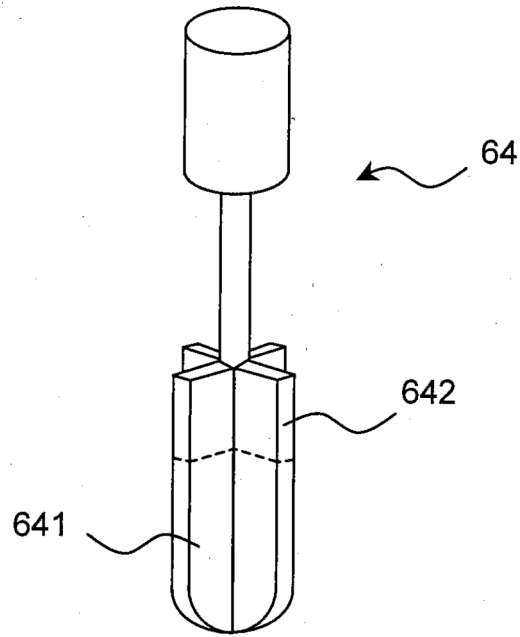


Fig. 9

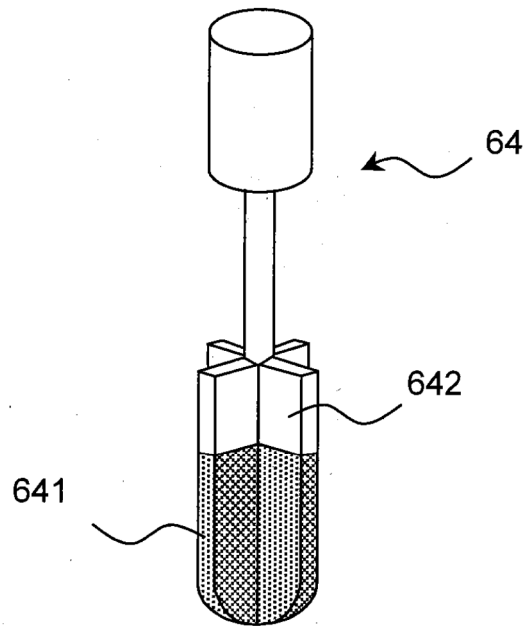


Fig. 10

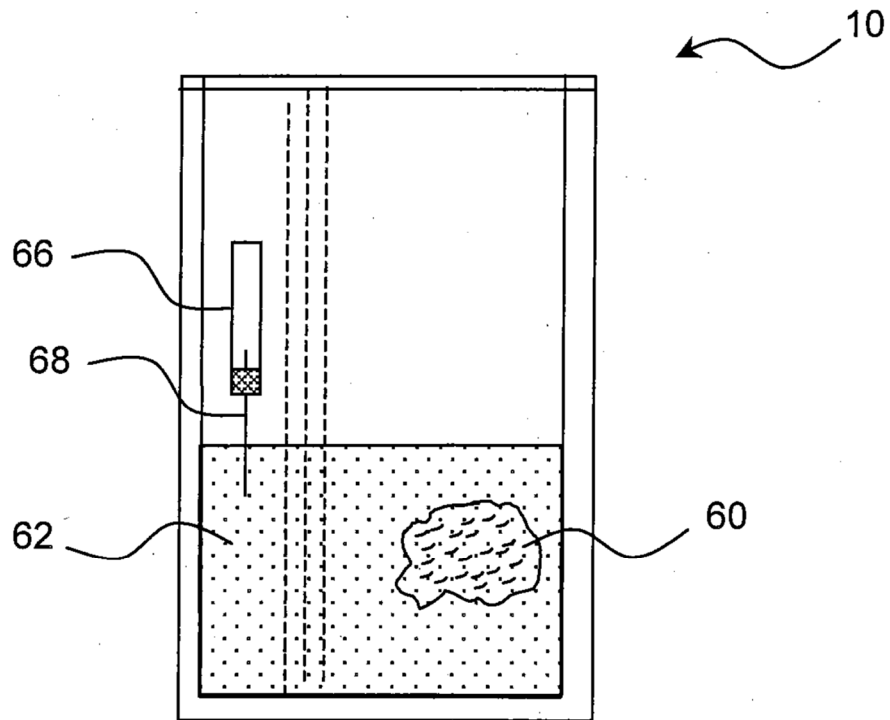


Fig. 11