



No. 13-024077- -00000-0000

Fecha: 2013-02-06 14:26:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 74



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

22. TITULO PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DIRECTA E
IDENTIFICACIÓN DE UN MICROORGANISMO EN UNA
MUESTRA BIOLÓGICA DILUIDA EN UN CALDO DE
ENRIQUECIMIENTO

CLASIFICACION
INTERNACIONAL

SOLICITANTES BIOMÉRIEUX

DOMICILIO MARCY L'ÉTOILE FRANCIA



No. 13-024077- -00000-0000

Fecha: 2013-02-06 14:26:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 74

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/FR2011/051624	Fecha 07/07/2011
Publicación Internacional No.		WO2012/004540 A1	Fecha 12/01/2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DIRECTA E IDENTIFICACIÓN DE UN MICROORGANISMO EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA DILUIDA EN UN CALDO DE ENRIQUECIMIENTO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1	BIOMÉRIEUX		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Chemin de l'Orme F-69280 Marcy L'étoile	No. TELÉFONO
CIUDAD			CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		FRANCIA	FRANCIA
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	ATRACHE,	Vincent	AU
2.	COLIN,	Bruno	FR
3.	LAFAY,	Aurelie	FR
4.	MAKROUF,	Bouchra	FR
5.	MONTES,	Pascal	FR
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
FR		CALUIRE	42, Cours Aristide Briand F-69300
FR		MARCY L'ETOILE	23, chemin des Garennes F-69280
FR		SAINT LAURENT DE VAUX	37, chemin de la Grande Serve F-69670
FR		LYON	18, rue Roger Salengro F-69009
FR		SAINTE CONSORCE	11, Impasse du Grand Cerisier F-69280
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
DELGADO VILLEGAS		JAIME EDUARDO	C.C. 19.270.955 T.P. 43.308 C.S.J.
DIRECCIÓN		Avda. Carrera 24 No. 37 - 31 Of. 202	No. TELÉFONO 2444096
CIUDAD		BOGOTA D.C.,	CORREO ELECTRÓNICO mde@mde.com
PAÍS		COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. FRANCIA		FR	1055574 08/07/2010



Industria y Comercio

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	SUPERINTENDENCIA (12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☐ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			FECHA DE PRESENTACIÓN	
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2.				
3.				
4.				
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2.				
3.				
4.				
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2.				
3.				
4.				
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
6. MOSTICONE,		David	FR	
7. RAYMOND,		Jean Claude	FR	
8. SOFIA,		Thierry	FR	
9. VIMONT,		Antoine	FR	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6. 115, rue Marcel Mérieux F-69280		Sainte Consorce		FR
7. 20 Allée du Clos du Centre F-69690		Bessenay		FR
8. 256, route de Charnay F-69480		Marcy		FR
9. 56, Rue de la Favorite F-69005		Lyon		FR
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION RELATIVE
 À LA PRÉSENTATION OU À LA TRANSMISSION
 DU DOCUMENT DE PRIORITÉ
 (instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
 bioMérieux
 Chemin de l'Orme
 F-69280 Marcy L'étoile
 FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 septembre 2011 (01.09.2011)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 08 juillet 2010 (08.07.2010)
Déposant BIOMÉRIEUX	

Le Bureau international notifie ci-après au déposant la date de réception (ou la date à laquelle celui-ci a été obtenu) du ou des documents de priorité concernant toute demande antérieure dont la priorité est revendiquée. Sauf indication contraire consistant en les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite, ou un astérisque figurant à côté d'une date de réception, **le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international, ou obtenu par ce dernier, conformément à la règle 17.1a), b) ou b-bis).** Le présent formulaire remplace toute notification antérieure relative à la présentation, à la transmission ou à l'obtention de documents de priorité.

Date de priorité	Demande de priorité n°	Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT	Date de réception du document de priorité
08 juillet 2010 (08.07.2010)	1055574	FR	12 août 2011 (12.08.2011)

Les lettres "NR" signalent un document de priorité qui, à la date d'expédition du présent formulaire, n'a pas encore été reçu ou obtenu par le Bureau international selon la règle 17.1.a), b) ou b-bis). Lorsque le déposant n'a pas présenté, demandé qu'il soit établi et transmis ou obtenu et transmis, ou demandé au Bureau international d'obtenir le document de priorité dans le délai prescrit par cette règle, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) selon laquelle aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Un astérisque "*" figurant à côté de la date de réception signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international, ou obtenu par ce dernier, mais de manière non conforme à la règle 17.1.a), b) ou b-bis) (le document de priorité a été reçu après le délai prescrit par la règle 17.1.a) ou la demande d'établissement et de transmission du document de priorité a été soumise à l'office récepteur après le délai prescrit par la règle 17.1.b) ou la demande afin qu'il se procure le document de priorité a été adressée à l'office récepteur ou au Bureau international après le délai prescrit par la règle 17.1.b-bis)). Même si le document de priorité n'a pas été remis conformément à la règle 17.1.a), b) ou b-bis), le Bureau international transmettra une copie du document aux offices désignés, pour leur appréciation. Dans le cas où une telle copie n'est pas acceptée par un office désigné comme document de priorité, la règle 17.1.c) énonce qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse n° de télécopieur +41 22 338 87 20	Fonctionnaire autorisé Beate Giffo-Schmitt e-mail pt03.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 03
--	---

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

**NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT**

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
bioMérieux
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'étoile
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 septembre 2011 (20.09.2011)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :

☒ la personne ☐ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse VIMONT, Antoine 56, Rue de la Favorite F-69005 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	

3. Observations complémentaires, le cas échéant :

La personne mentionnée au cadre 2 a été ajoutée à la demande internationale comme déposant pour les Etats-Unis d'Amérique seulement et inventeur pour tous les Etats désignés.

4. Une copie de cette notification a été envoyée

☒ à l'office récepteur ☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale ☐ aux offices désignés concernés
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire ☐ aux offices élus concernés
☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Deruaz Chantal e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09
--	--

n° de télécopieur +41 22 338 71 30

Formulaire PCT/IB/306 (janvier 2009)

1/T6MG4KSD0

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
bloMérieux
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'étoile
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 septembre 2011 (20.09.2011)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :		
☒ le déposant	☒ l'inventeur	☐ le mandataire ☐ le représentant commun
Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :		
☒ la personne	☐ le nom	☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile
Nom et adresse SOFIA, Thierry 258, route de Charnay F-69480 Marcy FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	
	☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	
3. Observations complémentaires, le cas échéant : La personne mentionnée au cadre 2 a été ajoutée à la demande internationale comme déposant pour les Etats-Unis d'Amérique seulement et inventeur pour tous les Etats désignés.		
4. Une copie de cette notification a été envoyée		
☒ à l'office récepteur	☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale	☐ aux offices désignés concernés	
☐ [A 1'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire	☐ aux offices élus concernés	
	☐ autre destinataire :	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Deruaz Chantal e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09
--	--

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
bioMérieux
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'étoile
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 septembre 2011 (20.09.2011)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :

☒ la personne ☐ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse RAYMOND, Jean Claude 20 Allée du Clos du Centre F-69690 Bessenay FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	

3. Observations complémentaires, le cas échéant :

La personne mentionnée au cadre 2 a été ajoutée à la demande internationale comme déposant pour les Etats-Unis d'Amérique seulement et inventeur pour tous les Etats désignés.

4. Une copie de cette notification a été envoyée

☒ à l'office récepteur ☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale ☐ aux offices désignés concernés
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire ☐ aux offices élus concernés
☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Deruaz Chantal e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09
--	--

n° de télécopieur +41 22 338 71 30

Formulaire PCT/IB/306 (janvier 2009)

1/T6MGGNCW0

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
bioMérieux
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'étoile
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 septembre 2011 (20.09.2011)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :		
☒ le déposant	☒ l'inventeur	☐ le mandataire
☐ le représentant commun		
Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :		
☒ la personne	☐ le nom	☐ l'adresse
☐ la nationalité		
☐ le domicile		
Nom et adresse MONTES, Pascal 11, Impasse du Grand Cerisier F-69280 Sainte Consorce FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	
3. Observations complémentaires, le cas échéant : La personne mentionnée au cadre 2 a été ajoutée à la demande internationale comme déposant pour les Etats-Unis d'Amérique seulement et inventeur pour tous les Etats désignés.		
4. Une copie de cette notification a été envoyée		
☒ à l'office récepteur	☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale	☐ aux offices désignés concernés	
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire	☐ aux offices élus concernés	
	☐ autre destinataire :	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Deruaz Chantal e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09
--	--

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
bioMérieux
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'étoile
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 septembre 2011 (20.09.2011)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :

☒ la personne ☐ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse MOSTICONE, David 115, rue Marcel Mérieux F-69280 Sainte Consorce FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	

3. Observations complémentaires, le cas échéant :

La personne mentionnée au cadre 2 a été ajoutée à la demande internationale comme déposant pour les Etats-Unis d'Amérique seulement et inventeur pour tous les Etats désignés.

4. Une copie de cette notification a été envoyée

☒ à l'office récepteur ☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale ☐ aux offices désignés concernés
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire ☐ aux offices élus concernés
☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse n° de télécopieur +41 22 338 71 30	Fonctionnaire autorisé Deruaz Chantal e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09
--	--

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
bioMérieux
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'étoile
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 septembre 2011 (20.09.2011)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :

☒ la personne ☐ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse LAFAY, Aurelie 37, chemin de la Grande Serve F-69670 Saint Laurent de Vaux FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	

3. Observations complémentaires, le cas échéant :

La personne mentionnée au cadre 2 a été ajoutée à la demande internationale comme déposant pour les Etats-Unis d'Amérique seulement et inventeur pour tous les Etats désignés.

4. Une copie de cette notification a été envoyée

☒ à l'office récepteur ☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale ☐ aux offices désignés concernés
☐ [à 1'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire ☐ aux offices élus concernés
☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Deruaz Chantal
n° de télécopieur +41 22 338 71 30	e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
bioMérieux
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'étoile
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 septembre 2011 (20.09.2011)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :		
☒ le déposant	☒ l'inventeur	☐ le mandataire
☐ le représentant commun		
Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :		
☒ la personne	☐ le nom	☐ l'adresse
☐ la nationalité		
☐ le domicile		
Nom et adresse MAKROUF, Bouchra 18, rue Roger Salengro F-69009 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	
3. Observations complémentaires, le cas échéant : La personne mentionnée au cadre 2 a été ajoutée à la demande internationale comme déposant pour les Etats-Unis d'Amérique seulement et inventeur pour tous les Etats désignés.		
4. Une copie de cette notification a été envoyée		
☒ à l'office récepteur	☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale	☐ aux offices désignés concernés	
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire	☐ aux offices élus concernés	
	☐ autre destinataire :	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Deruaz Chantal
n° de télécopieur +41 22 338 71 30	e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
bioMérieux
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'étoile
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 septembre 2011 (20.09.2011)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)	

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :

☒ la personne ☐ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse COLIN, Bruno 23, chemin des Garennes F-69280 Marcy l'Etoile FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	

3. Observations complémentaires, le cas échéant :
La personne mentionnée au cadre 2 a été ajoutée à la demande internationale comme déposant pour les Etats-Unis d'Amérique seulement et inventeur pour tous les Etats désignés.

4. Une copie de cette notification a été envoyée

☒ à l'office récepteur	☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale	☐ aux offices désignés concernés
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire	☐ aux offices élus concernés
	☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Deruaz Chantal
n° de télécopieur +41 22 338 71 30	e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SPRUGNOLI, Claude
bioMérieux
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'étoile
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 septembre 2011 (20.09.2011)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire TALKING BAG	
Demande internationale n° PCT/FR2011/051624	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2011 (07.07.2011)	

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :

☒ la personne ☐ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse ATRACHE, Vincent 42, Cours Aristide Briand F-69300 Caluire FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) AU	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone	
	n° de télécopieur	
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	

3. Observations complémentaires, le cas échéant :
La personne mentionnée au cadre 2 a été ajoutée à la demande internationale comme déposant pour les Etats-Unis d'Amérique seulement et inventeur pour tous les Etats désignés.

4. Une copie de cette notification a été envoyée

☒ à l'office récepteur	☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale	☐ aux offices désignés concernés
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire	☐ aux offices élus concernés
	☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Deruaz Chantal
n° de télécopieur +41 22 338 71 30	e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09

14

**PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DIRECTA E IDENTIFICACIÓN DE UN
MICROORGANISMO EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA DILUIDA EN UN
CALDO DE ENRIQUECIMIENTO**

5 La presente invención se refiere en general al campo del análisis, por ejemplo, al análisis biológico. Más concretamente, 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, en el interior de un recipiente cerrado.

10 El análisis microbiológico requiere técnicas precisas para las que el tiempo de obtención del resultado debe ser tan corto como sea posible.

 En el campo médico, es necesario prever y diagnosticar el riesgo de infección: cuanto más rápido y más preciso sea el diagnóstico, más eficaz será la gestión de los pacientes y menor el riesgo de transmisión. El enfoque es
15 similar para la salud animal.

 En el ámbito agroalimentario, los problemas son idénticos. Sin embargo, se destacan:

- los microorganismos patógenos y sus toxinas, cuya presencia se busca en materias primas, productos intermedios y productos acabados comercializados,
- los microorganismos no patógenos utilizados como indicadores de calidad en el procedimiento de producción, desde las materias primas hasta los productos acabados, a lo largo de toda la cadena, y
- las bacterias de interés tecnológico tales como las enzimas.

25 La detección rápida y precisa de presuntas contaminaciones permite que

sean monitorizadas y por lo tanto permite poner en marcha acciones correctivas.

Técnicamente, el análisis microbiológico puede poner en práctica una o más fases de pre-enriquecimiento y/o enriquecimiento, una o más fases de
5 detección, y una o más fases de recuento de microorganismos. Para aplicaciones concretas, tales como la vigilancia microbiológica agroalimentaria, también puede ser necesaria una fase de confirmación, con el fin de cumplir con las normas vigentes en este campo.

Actualmente no existe ningún procedimiento para detectar un
10 microorganismo diana en una cantidad de muestra inicial grande, sin hacer uso de una etapa de enriquecimiento.

La fase de pre-enriquecimiento y/o enriquecimiento hace uso de medios de cultivo selectivos o no selectivos, que tienen como objetivo promover el crecimiento de los microorganismos diana en muestras biológicas o
15 ambientales, limitando al mismo tiempo el crecimiento de la flora no diana. Los medios se utilizan con frecuencia en recipientes estériles de plástico de tipo bolsa, en los que se ponen en contacto con muestras ambientales o de alimentos con el fin de volver a suspender y volver a enriquecer los microorganismos buscados. Esta fase es necesaria con el fin de cumplir con el
20 requisito de poner de manifiesto la presencia inicial potencial de por lo menos un microorganismo diana en una cantidad de muestra muy variable y posiblemente muy grande, por ejemplo de 25 gramos (g) a 375 g diluida en 225 mililitros (ml) a 3.375 ml en el medio de cultivo. Al final de esta etapa de enriquecimiento, se muestrea una alícuota (de 5 microlitros (µl) a 5 ml) para
25 poner en práctica la etapa de detección de los microorganismos diana. Es

necesario disponer de una cantidad suficiente de microorganismos diana en esta alícuota para permitir su detección sistemática.

La fase de detección se basa históricamente en el cultivo de los microorganismos en un medio de agar, para demostrar las características metabólicas de los microorganismos buscados. Convencionalmente se utilizan sustratos enzimáticos específicos. Estos sustratos enzimáticos se componen generalmente de dos partes, una primera parte que es específica para la actividad enzimática que se pondrá de manifiesto, también denominada parte diana, y una segunda parte que actúa como un marcador, denominada parte de marcador, generalmente constituida por un cromóforo o un fluoróforo. Al elegir estos sustratos dependiendo de si existe o no una reacción, es posible caracterizar la naturaleza de un microorganismo o diferenciar entre diferentes grupos de microorganismos. Por lo tanto, la aparición o la desaparición de una coloración o de una fluorescencia indicarán un género o un tipo de microorganismos. En este sentido, el uso de medios cromogénicos permite detectar e identificar simultáneamente los gérmenes buscados. Esto simplifica el procedimiento y reduce considerablemente el tiempo de obtención del resultado. A modo de ejemplo, se podrían citar los medios ChromID® del solicitante. Estos medios cromogénicos se basan en la detección de las características metabólicas específicas de los gérmenes buscados, tales como la actividad enzimática beta-glucuronidasa para *Escherichia coli*, por ejemplo.

Los inmunoensayos constituyen otra de las tecnologías utilizadas para el ensayo de detección. Éstos hacen uso de las características inmunogénicas de los microorganismos buscados. Sin ánimo de exhaustividad, se pueden citar las técnicas de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)

competitiva o de tipo sándwich.

Por último, también se emplean técnicas de biología molecular basadas en las características genómicas de los microorganismos buscados para detectar e identificar los microorganismos diana. A modo de ejemplo, es posible
5 citar técnicas de amplificación convencionales tales como la PCR (reacción en hebra de la polimerasa) y la NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos), que se pueden asociar con técnicas de detección en tiempo real conocidas por la persona experta en la materia.

Sin embargo, el uso de todas estas técnicas requiere que la bolsa se
10 abra al final de la fase de pre-enriquecimiento/enriquecimiento con el fin de recuperar una alícuota del homogeneizado y para llevar a cabo la etapa de detección.

La fase de confirmación, por su parte, está más especialmente asociada con el análisis microbiológico en el campo agroalimentario. En efecto, cuando
15 el resultado de los procedimientos expuestos anteriormente es positivo, es necesario confirmar la presencia del agente patógeno buscado. Esto requiere un ensayo complementario y el uso de un principio de detección que es diferente al utilizado durante el primer análisis. Para la confirmación se utilizan las técnicas descritas *supra*, a voluntad.

Por lo tanto, la identificación completa y precisa de un microorganismo
20 en una muestra requiere una secuencia de varias etapas: enriquecimiento, detección y confirmación. La estandarización de los ensayos utilizados de manera rutinaria ha permitido la automatización de los procedimientos de detección, aunque su aplicación sigue siendo larga. En efecto, una desventaja
25 del estado de la técnica es que estas etapas se llevan a cabo secuencialmente

y requieren un gran número de manipulaciones que requieren mucho tiempo, lo que repercute en el tiempo necesario para obtener resultados.

Además, las técnicas descritas *supra* requieren que las bolsas de enriquecimiento sean abiertas una vez o más para muestrear las alícuotas.

- 5 Cuanto mayor sea el número de muestras negativas durante la identificación sistemática (especialmente en las industrias agroalimentarias), más perjudicial resulta. Por tanto, es beneficioso para el manipulador no tener que volver a abrir los recipientes para averiguar el resultado de positividad/negatividad de la muestra estudiada.

- 10 Con respecto a los problemas técnicos asociados con el estado de la técnica considerada 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 las muestras, en concreto muestras agroalimentarias.

- 15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la detección, la identificación y la confirmación de los microorganismos, que limite la manipulación de la muestra contenida en el recipiente, limitando de ese modo los riesgos de contaminación, tanto del personal que manipula la muestra como de la propia muestra.

- 20 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la detección y la identificación de microorganismos, que reduzca el tiempo necesario para el análisis de la muestra.

- 25 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la detección, la identificación y la confirmación de los microorganismos en el volumen total de la muestra durante el enriquecimiento, aumentando

manifiestamente la sensibilidad de la medición, e incluso su especificidad.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento que haga posible aumentar considerablemente la velocidad del análisis de las muestras.

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

Otro objetivo de la presente invención es mejorar la trazabilidad del análisis reduciendo drásticamente las etapas de manipulación de la muestra.

- 10 Estos objetivos, entre otros, se alcanzan mediante la presente invención, que en primer lugar se refiere a un procedimiento de detección de por lo menos un microorganismo presente en una muestra colocada en un recipiente cerrado, comprendiendo básicamente dicho procedimiento las siguientes etapas:

- 15 a) Colocar dicha muestra en contacto en el recipiente con por lo menos un medio de cultivo y un soporte capaz de capturar el microorganismo o los microorganismos a detectar,
- b) Cerrar el recipiente,
- c) Colocar el recipiente en condiciones capaces de permitir el crecimiento del microorganismo o de los microorganismos,
- 20 d) Detectar, dentro de dicho recipiente cerrado, utilizando un medio de detección, la presencia del microorganismo o de los microorganismos fijados sobre el soporte de captura.

- De acuerdo con una forma de realización concreta, durante la etapa a) se pone en contacto en el recipiente un sistema indicador de presencia capaz
- 25 de permitir detectar la presencia del microorganismo o de los microorganismos.

Se entiende por sistema indicador de presencia cualquier molécula capaz de acoplarse con los microorganismos o las parejas de unión de dichos microorganismos que, en virtud de sus propiedades de transducción (fluorescencia, coloración, radiactividad en concreto), hacen posible poner de
5 manifiesto la presencia de dichos microorganismos.

De acuerdo con otra forma de realización concreta, el procedimiento según la invención incluye una etapa intermedia c') que consiste en la transferencia de toda la mezcla, o parte de ella, constituida por dicha muestra, el medio de cultivo, el soporte capaz de capturar el microorganismo o los
10 microorganismos a detectar y, potencialmente, un sistema indicador de presencia, del recipiente, denominado en este caso recipiente principal, a por lo menos un segundo recipiente, denominado recipiente secundario, en el que es posible llevar a cabo potencialmente un segundo enriquecimiento añadiendo de antemano en dicho recipiente secundario los elementos nutritivos y agentes
15 selectivos *ad hoc*. Un segundo enriquecimiento de este tipo aumenta la población del microorganismo o de los microorganismos diana en relación con la de los microorganismos no diana, lo que mejora la especificidad.

Ventajosamente, sobre el soporte de captura se fija por lo menos una pareja de unión específica o no específica del microorganismo o de los
20 microorganismos. De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, la pareja de unión específica se toma del grupo que comprende: anticuerpos, fragmentos Fab, fragmentos Fab', proteínas de fago recombinantes o no recombinantes y fagos o cualquier otro ligando bien conocido por la persona experta en la materia.

25 Ventajosamente, los medios de detección se toman del grupo que

comprende: medios de detección eléctricos, en concreto, medios de detección electroquímicos, medios de detección ópticos, medios de detección acústicos, medios de detección térmicos, medios de detección mecánicos y medios de detección magnéticos.

- 5 El soporte de captura puede ser un soporte convencional. En concreto, se citan soportes particulados, potencialmente magnéticos, o soportes de una sola pieza. Puede ser simplemente un soporte inerte, tal como una placa de fibra de vidrio o plástico. A continuación, se conecta un soporte de captura de este tipo al medio de detección. El soporte de captura puede sensibilizarse
- 10 ventajosamente con una pareja de unión, potencialmente específica.

Como alternativa, el soporte de captura puede estar integrado en los medios de detección. Este es el caso, por ejemplo, en el que el soporte de captura está constituido por un biodetector electroquímico o una fibra óptica.

- De acuerdo con una forma de realización concreta, es totalmente posible
- 15 prever la combinación del medio de detección con el fin de realizar la detección y de llevar a cabo la confirmación simultáneamente o posteriormente. Por ejemplo, es posible realizar la detección del microorganismo o de los microorganismos diana por medio de un biodetector electroquímico. Si los microorganismos diana se fijan a través de parejas de unión específicas, la
- 20 etapa de detección en este caso constituye una etapa de identificación. Un análisis óptico de los microorganismos fijados específicamente sobre el biodetector en la zona de análisis mediante el dispositivo de detección óptico permite la identificación de los microorganismos a confirmar. Si el dispositivo de detección óptico es un espectrómetro de Raman, entonces un análisis del
- 25 espectro Raman por comparación con una base de datos de los espectros de

referencia correspondientes a los diferentes microorganismos diana, hace posible confirmar la identificación de dicho microorganismo.

De acuerdo con otra forma de realización concreta, es posible realizar la detección y la confirmación con la misma tecnología. Por lo tanto, si el medio de detección es un medio óptico tal como un medio de medición de fluorescencia intrínseca, resulta especialmente ventajoso realizar la detección de los microorganismos diana por la aparición de fluorescencia intrínseca. La respuesta es en este caso "sí" (presencia de fluorescencia) o "no" (ausencia de fluorescencia). Si hay fluorescencia, entonces, un análisis espectral de la señal de fluorescencia comparado con una base de datos de espectros de referencia correspondiente a los diferentes microorganismos diana permite que dicho microorganismo sea identificado, y permite de ese modo la detección de la presencia de dicho microorganismo a confirmar.

Preferentemente, la detección del microorganismo o de los microorganismos se realiza en tiempo real. No obstante, como alternativa, la detección del microorganismo o de los microorganismos se puede lograr, al final, después de la etapa de crecimiento de dicho microorganismo o microorganismos.

De acuerdo con una forma de realización concreta del procedimiento según la invención, el recipiente es una bolsa de homogeneización. Podrían utilizarse igualmente recipientes rígidos, tales como matraces, botellas o frascos.

De acuerdo con otra forma de realización concreta del procedimiento según la invención, el medio de detección está conectado a un sistema de análisis de datos.



Ventajosamente, la conexión entre los medios de detección y el dispositivo de análisis de datos es una conexión por cable o una conexión inalámbrica.

La invención también se refiere a un biodetector electroquímico para la
5 detección de por lo menos un microorganismo presente en una muestra colocada en un recipiente cerrado. Dicho biodetector comprende un soporte que incluye:

- por lo menos un electrodo de detección, recubierto con por lo menos un polímero electroactivo, sobre un extremo del cual se fija por lo menos un
10 oligonucleótido monocatenario o bicatenario, estando el segundo extremo de dicho oligonucleótido unido a por lo menos una pareja de unión del microorganismo o de los microorganismos a detectar, específica o no específica;
- por lo menos un contraelectrodo.

15 Ventajosamente, el polímero electroactivo se toma del grupo que comprende polipirrol, poliacetileno, poliazina, poli(p-fenileno), poli(p-fenileno vinileno), polipireno, politiofeno, polifurano, poliselenofeno, polipiridazina, policarbazol, y polianilina.

De acuerdo con una forma de realización concreta, el polímero
20 electroactivo incluye por lo menos un mediador electroquímico. Un mediador electroquímico de este tipo se toma del grupo que comprende ferroceno, quinona y derivados de éstos o cualquier otro mediador bien conocido por la persona experta en la materia.

De acuerdo con una forma de realización alternativa, el mediador
25 electroquímico está en forma libre en el medio de cultivo. Un mediador de este

tipo puede ser, por ejemplo, el par ferricianuro/ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, el par cloruro de iridio $[\text{IrCl}_6]^{3-/4-}$, o rutenio hexamina $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$.

La unión entre el oligonucleótido y la pareja de unión del microorganismo o de los microorganismos se efectúa preferentemente por medio de por lo menos un par de unión biotina-estreptavidina o biotina-avidina.

Cuando el oligonucleótido es monocatenario, se fija una biotina sobre el extremo 3' de dicho nucleótido, permitiendo el extremo 5' que éste último se una sobre el polímero electroactivo, en concreto mediante un enlace covalente. Mediante el uso de una pareja de unión que también está biotinilada, resulta entonces fácil unir este al extremo 3' del oligonucleótido a través de una molécula de estreptavidina o avidina.

Cuando el oligonucleótido es bicatenario, la primera hebra se fija, en particular mediante un enlace covalente, al polímero electroactivo a través de su extremo 5'. La segunda hebra por su parte está biotinilada en su extremo 5', lo que permite a la pareja de unión, también biotinilada, que se fije a través de una molécula de estreptavidina o avidina.

Ventajosamente, la pareja de unión se toma del grupo que comprende: anticuerpos, fragmentos Fab, fragmentos Fab', proteínas de fago recombinantes o no recombinantes y fagos.

Los objetivos y las ventajas de la presente invención se entenderán mejor a la luz de la siguiente descripción detallada y de los dibujos asociados en los cuales:

- La figura 1 representa una bolsa de pre-enriquecimiento y/o enriquecimiento en combinación con un biodetector electroquímico.
- La figura 2 representa una vista frontal del biodetector

nb

electroquímico.

- La Figura 3A es una representación de la superficie del detector electroquímico no estando presente el microorganismo.

5 - La Figura 3B es una representación de la superficie del detector electroquímico estando presente el microorganismo.

- La figura 4 es una representación esquemática de un sistema para analizar la bolsa de pre-enriquecimiento/enriquecimiento con el biodetector electroquímico.

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

- La figura 6 es un gráfico de las mediciones de espectrometría de impedancia obtenidas durante la detección de *Listeria innocua* en una muestra de alimento.

15 - La figura 7 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, de acuerdo con una primera forma de realización.

20 - La figura 8 es una representación esquemática del sistema de análisis tal como se representa en la figura 7, con una posición de la bolsa que permite la lectura del soporte de captura sensibilizado.

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

25 - La Figura 10 es una representación esquemática del soporte de captura sensibilizado, representado en la figura 8, después de un

análisis que dio un resultado 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, de acuerdo con una segunda forma de realización.

De acuerdo con una primera forma de realización de la presente invención, el procedimiento de detección o de identificación de microorganismos consiste en el empleo de una bolsa de homogeneización de plástico estéril, denominada convencionalmente bolsa de Stomacher®. A dicha bolsa se le ha asignado el número de referencia 10 en la figura 1. Esta bolsa 10 está constituida por dos láminas de plástico aproximadamente rectangulares, 12 y 14, unidas una a otra por 3 de sus lados, de manera que definan un espacio interior para recibir el medio de cultivo y la muestra a analizar. Sus accesorios comprenden un filtro 16 aproximadamente rectangular conectado a las láminas 12 y 14 por un lado, que separa el espacio interior en dos. La bolsa contiene finalmente un biodetector 18. Este biodetector es un biodetector electroquímico, que se representa detalladamente en la figura 2. El biodetector 18 está metido entre las láminas 12 y 14, de manera que una parte 181 que corresponde a la zona de detección se encuentre en el espacio interior de la bolsa 10, mientras que una parte correspondiente a la zona de conexión se encuentre fuera de la bolsa, a fin de permitir que el chip se conecte a un dispositivo de análisis de datos. Esto se explica *infra*.

La Figura 2 representa detalladamente el biodetector electroquímico 18. Como se ha explicado anteriormente, el biodetector 18 está constituido por una zona de análisis 181 y una zona de conexión 182. La zona de análisis incluye

ocho electrodos de trabajo 20, dispuestos alrededor de un electrodo central, denominado contraelectrodo, 22. Además, la zona de análisis contiene un electrodo de referencia 24, en forma de anillo abierto situado alrededor del contraelectrodo 22. Todos estos electrodos están unidos independientemente a diez extremos de conexión 26, por medio de unas pistas conductoras 28. Los extremos de conexión están hechos del mismo material que los electrodos de trabajo. Este material es preferentemente oro. No obstante, se puede utilizar cualquier otro material conductor bien conocido por la persona experta en la materia, tal como carbón, platino o diamante. El material que constituye el soporte de los electrodos es un material polímero, tal como poliimida. Sin embargo se puede prever el uso de cualquier otro material con propiedades equivalentes bien conocidas por la persona experta en la materia.

Cabe señalar que la configuración de los electrodos que se presenta en la figura 2 es sólo una configuración entre otras, y de ninguna manera limita el ámbito de la protección conferida por la presente solicitud de patente.

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

En los electrodos de trabajo, se pueden ver tres capas superpuestas. La primera de estas capas 30 es la capa de polímero que constituye el soporte biodetector. La capa intermedia 32 es la capa de material conductor, por lo general oro. Finalmente, la capa 34 es una capa de polímero conjugado electroactivo. Un polímero de este tipo es por ejemplo un polipirrol. Tales polímeros son bien conocidos por su carácter conductor y electroactivo. También se sabe que los polipirroles mantienen su conductividad y su

electroactividad cuando se sustituyen determinados ciclos pirrol en la posición 3 ó 4 con grupos funcionales. Polímeros que portan este tipo de grupo funcional se describen en el documento WO-A1 - 95/29199, Garnier y col. (Synthetic Metals, 100: 89-94,1999) Ho-Hoang y col. (Synthetic Metals, 62: 277-280, 1994), Ho-Hoang y col. (J. Mater. Chem., 6 (7), 1107- 1112,1996), y Korri-Yousoufi y col. (Materials Science and Engineering, CI 5, 265-268,2001). Por lo tanto, se pueden injertar diferentes moléculas en los grupos funcionales portados por un monómero de polipirrol. El documento WO-A1-95/29199 describe así la síntesis de un polipirrol obtenida por electro-oxidación a un potencial superior o igual a 0,8 V/ECS. La síntesis de polipirrol por oxidación electroquímica conduce a la formación de una película electroactiva en la superficie del electrodo, más concretamente en un sustrato conductor en forma de película autoportante. Este es un procedimiento de inmovilización indirecta de oligonucleótidos en polipirrol. Los monómeros de pirrol sustituidos en la posición 3 del núcleo pirrol con grupos funcionales se diluyen en una solución de monómeros no sustituidos, que inmovilizará los grupos funcionales durante su electrocopolimerización por inclusión en la cadena de unidades funcionales. En una segunda etapa, se acopla químicamente un anti-ligando, tal como un oligonucleótido, un polinucleótido o un péptido, sobre los grupos funcionales del polímero precursor. El polímero así obtenido mantiene sus propiedades conductoras y electroactivas. Por lo tanto, se pueden utilizar estos polímeros para detectar un analito que interactúe específicamente con el anti-ligando injertado sobre el polímero midiendo una diferencia de potencial o una variación de corriente: el documento WO-A1-00/77523 describe también el acoplamiento químico de un anti-ligando, tal como un oligonucleótido, sobre un

polímero precursor que porta grupos funcionales.

Esto también puede ser un procedimiento de inmovilización directa de oligonucleótidos en polipirrol por electrocopolimerización. Los monómeros de pirrol sustituidos en la posición 3 del núcleo pirrol con oligonucleótidos se diluyen en una solución de monómeros no sustituidos, que inmovilizarán los oligonucleótidos directamente durante su electrocopolimerización por inclusión en la cadena de unidades funcionales.

Sobre esta capa de polímero electroactivo, se injerta una doble hebra de ácido nucleico 36, a través del extremo 5' de una de estas hebras, portando la hebra complementaria una molécula de biotina 38 en su extremo 5', de manera que sea posible una unión a un pareja de unión específica 40 también unida a una biotina 42 a través de una molécula de estreptavidina 44. La pareja de unión específica 40 representada en las figuras 3A y 3B es un anticuerpo. Puede ser uno o más anticuerpos monoclonales o policlonales. También puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab o Fab'2, así como cualquier anticuerpo obtenido por recombinación o modificación genética y específico de un microorganismo concreto.

Como alternativa, la pareja de unión específica puede ser un fago o una proteína de fago recombinante, que se une específicamente a los microorganismos diana. Tales proteínas y su uso para la captura de las bacterias se describen en la patente EP-B-1 356 080, entre otras.

Cabe señalar que la estructura representada en las figuras 3A y 3B es sólo un ejemplo entre otros, y no debe entenderse de ninguna manera como una restricción de la invención. De hecho, como una variación, se puede prever fijar la molécula anti-ligando directamente sobre el electrodo sin utilizar la doble

hebra de ácido nucleico.

Con el fin de realizar el análisis, el biodetector electroquímico, unido a la bolsa de la homogeneización, se pone en contacto con la muestra dispersada, el medio de cultivo y un mediador electroquímico, tal como el par
5 ferricianuro-ferrocianuro. En ausencia de microorganismos, tiene lugar un intercambio de electrones entre el polímero conjugado electroactivo y dicho sistema redox presente en el medio de reacción. Esto se muestra en la figura 3A. El intercambio de electrones se transforma en corriente eléctrica y se mide por espectroscopia electroquímica, utilizando un potencióstato, como se explica
10 *infra*.

Cuando la muestra contiene microorganismos 44, son capturados por las moléculas anti-ligando 40. La presencia de microorganismos en la proximidad del electrodo provoca un impedimento estérico, que interrumpe y disminuye el flujo de electrones entre el electrodo modificado por el polímero
15 conjugado electroactivo y dicho sistema redox presente en el medio de reacción. A continuación, se mide esta modificación por medición de la impedancia y se caracteriza por la resistencia a la transferencia de cargas, resistencia cuyo valor aumenta cuando se capturan las bacterias (resultado positivo).

20 El sistema de medición de los resultados del análisis se representa esquemáticamente en la figura 4, de acuerdo con una primera forma de realización. Como puede verse en esta figura, la bolsa 10, por medio de su biodetector 18, está conectada a un potencióstato 50. Esta conexión se efectúa mediante un conector 52, que está conectado a la zona de conexión 182 del
25 biodetector 18. El conector 52 se extiende por un cable 54 unido al

potenciostato 50. El potenciostato, por su parte, está unido a un sistema informático 56 capaz de registrar y analizar los datos de medición de la impedancia.

Para los fines de detección de los microorganismos, la bolsa de
5 homogeneización 10 se incuba preferentemente durante tanto tiempo como
sea necesario para permitir el crecimiento de los microorganismos. Esta
incubación se puede realizar convencionalmente en una incubadora a una
temperatura de entre 25 °C y 45 °C. El tiempo de incubación puede variar de 3
a 72 horas dependiendo de la cantidad inicial de microorganismos presentes en
10 la muestra y del tipo de microorganismo a detectar.

De acuerdo con una primera forma de realización, la medición de la
impedancia se puede realizar al final. De hecho, la bolsa de homogeneización
se incuba durante el tiempo que sea necesario y suficiente para el crecimiento
de los microorganismos, a continuación se saca de la incubadora y se conecta
15 al sistema de medición de la impedancia descrito *supra*. A continuación se
realiza la medición de la impedancia y se compara el resultado con un valor de
la impedancia de referencia. Una medición de la impedancia de este tipo es
posible en la medida en que uno o más electrodos de trabajo 20 están
recubiertos con polímero electroactivo conjugado y/o una molécula anti-ligando
no-específica para el microorganismo a detectar. La medición de la impedancia
20 en este/estos electrodo(s) constituye el valor de la impedancia de referencia.
En la medida en que la diferencia entre el valor de la impedancia en los
electrodos de detección (electrodos sobre los que las moléculas anti-ligando
del microorganismo diana están directa o indirectamente fijadas) y el valor de
25 referencia sea superior a un valor umbral, la detección de los microorganismos

es eficaz.

Una segunda forma de realización es en momentos puntuales, es decir mediante mediciones puntuales de la impedancia durante la incubación. En este caso, la bolsa de homogeneización se saca de la incubadora y se conecta al sistema de medición de la impedancia, durante el tiempo necesario para la medición, y a continuación se incuba de nuevo. El intervalo entre dos mediciones puede ser de entre 30 segundos y 2 minutos. Esta segunda forma de realización tiene como ventaja principal sobre la primera forma de realización la capacidad de detectar la presencia de los microorganismos después de un tiempo de incubación más corto.

Finalmente, en una tercera forma de realización que es la forma de realización preferente, se prevé disponer en el interior de la incubadora de un medio para conectar el biodetector al sistema de medición de la impedancia. Puede ser un sistema de conexión inalámbrica o por cable. Una forma de realización de este tipo resulta especialmente ventajosa porque hace posible llevar a cabo una medición a intervalos regulares dentro de las bolsas de homogeneización sin tener que manipular estas últimas. Además, la medición de la impedancia a intervalos regulares hace posible llevar a cabo la detección de microorganismos en tiempo real. Cuando se une a un sistema informático que avisa al personal técnico cuando se efectúa una detección, este último ya no está limitado por el volumen de trabajo que consiste en realizar mediciones sucesivamente a lo largo del tiempo. Su intervención se requiere solamente cuando se detecta un microorganismo en una bolsa.

Un medio de conexión por cable está constituido por cualquier medio que haga posible conectar dos dispositivos electrónicos entre sí a fin de

permitir la transmisión de datos. En concreto, un medio de conexión por cable puede ser un sistema de conexión en serie (estándar RS 485, RS 232), un sistema de conexión USB (bus de serie universal), un sistema de conexión de red (Ethernet), un sistema de conexión en paralelo (GPIB) o cualquier otro
 5 medio equivalente.

Un medio de conexión inalámbrica es un transmisor-receptor de ondas de radio. Por ejemplo, puede ser un sistema Wi-Fi (estándar 802.11b), Bluetooth (estándar 802.15) o ZigBee (estándar 802.15.4).

De acuerdo con una alternativa, el medio de adquisición de datos puede ser un lector RFID (identificación por radiofrecuencia), una tarjeta Labjack o cualquier otro medio bien conocido por la persona experta en la materia.
 10

De acuerdo con una alternativa al procedimiento según la invención, esto puede ponerse en práctica mediante un medio de detección óptico. Este medio de detección puede ser independiente del soporte de captura. Este es el
 15 caso por ejemplo de un detector óptico, tal como una cámara. Como alternativa, el medio de detección óptico y el soporte de captura pueden estar integrados. Este es el caso por ejemplo de una fibra óptica, cuyo extremo actúa como soporte de captura.

En la figura 7 se representa una alternativa de este tipo. Se incubaba una
 20 bolsa de homogeneización cerrada 10, como se ha descrito anteriormente, con una muestra de alimento 60, constituido en este caso por una muestra de carne picada. Esta muestra de alimento 60 se sumerge en un medio de cultivo 62, complementado con un sistema indicador de presencia. También se coloca en la bolsa de homogeneización 10 un soporte de captura sensibilizado 64,
 25 mantenido en su lugar en la bolsa mediante cualquier medio apropiado, y se

sumerge en el medio de cultivo 62. El soporte de captura sensibilizado 64 se funcionaliza mediante por lo menos una pareja de unión específica para un microorganismo diana a detectar. El soporte de captura puede estar constituido por cualquier soporte capaz de fijar las parejas de unión específicas y bien conocido por la persona experta en la materia. A modo de ejemplo no limitativo, un soporte de captura apropiado puede estar hecho de poliestireno irradiado, tal como el comercializado por la empresa Nunc/Thermo Scientific (Cat. No. 472230). En la figura 9 se representa esquemáticamente un soporte de captura de este tipo, con la referencia 64. Ventajosamente y de acuerdo con una forma de realización preferente, la parte inferior puede estar dividida en dos. La zona con la referencia 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 se mantiene libre de cualquier pareja de unión y por lo tanto actúa como control negativo.

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

Estas últimas pueden colorearse al tiempo que crecen, gracias al sistema indicador de presencia contenido en el medio de cultivo.

De acuerdo con un ejemplo concreto, el sistema indicador de presencia se basa en la reducción del TTC por los microorganismos. Al tiempo que crecen, el TTC (incoloro en su forma no reducida) es internalizado por dichos microorganismos, a continuación reducido por estos últimos a trifeníl-formazan (rojo), coloreando así dichos microorganismos de rojo y permitiéndoles ponerse

de manifiesto en el soporte.

El procedimiento de detección directo en tiempo real de microorganismos en una muestra de alimento, durante el período de incubación, se lleva a cabo de forma automática o no automática mediante la
5 lectura óptica de un soporte de captura sensibilizado. La incubación puede realizarse a temperaturas entre 25 °C y 44 °C durante 6 horas a 48 horas.

Además, una vez que se captura de manera eficaz una determinada cantidad de microorganismos teñidos de color (en el caso de una muestra positiva), tiene lugar un cambio en las propiedades ópticas del soporte por la
10 aparición de una coloración roja sobre el mismo (es decir, la transducción de la señal biológica). A continuación, esta coloración del soporte de captura es detectable a simple vista o mensurable mediante el uso de una máquina de lectura tal como una cámara. El soporte de captura se representa esquemáticamente en la figura 10 después del análisis que da un resultado
15 positivo. Como puede verse, la zona 641 aparece coloreada debido a la fijación de los microorganismos diana en las parejas de unión específicas. La zona 642, que actúa como control negativo, mantiene el color inicial del soporte de captura.

Para facilitar la lectura, resulta preferible que el soporte de captura
20 sensibilizado ya no esté en contacto con el medio de cultivo. Para este fin, se puede prever, por ejemplo, inclinar la bolsa de homogeneización 10, que se representa bien en la figura 8. Como se ha explicado *supra*, la lectura puede llevarse a cabo al final puntualmente, o en tiempo real.

De acuerdo con otra alternativa del procedimiento según la invención, el
25 soporte de captura está constituido por partículas sensibilizadas, es decir que

portan una pareja de unión específica o no específica para el microorganismo o los microorganismos a detectar. A continuación, la detección se demuestra preferentemente por la presencia de aglutinación en tiempo real de las partículas sensibilizadas, mediante los microorganismos diana unidos a estas
5 últimas, durante el período de incubación. Una forma de realización de este tipo se describe en el documento WO-A-2009/122069.

De acuerdo con una forma de realización concreta, las partículas sensibilizadas pueden ser partículas magnéticas. Esta forma de realización consiste en detectar directamente, por la aglutinación de las partículas
10 magnéticas sensibilizadas, la presencia del microorganismo diana (es decir, *E. coli* O157:H7) en una muestra de alimento durante el enriquecimiento. La detección se realiza durante el periodo de incubación por inmersión de las partículas magnéticas sensibilizadas con una pareja de unión específica (es decir, proteína de fago recombinante anti-*E coli* O157:H7) en el recipiente
15 cerrado que contiene la muestra de alimento, diluida en el medio de cultivo.

En esta alternativa, puede resultar ventajoso utilizar un recipiente secundario de tipo de tubo en el interior del recipiente principal (bolsa de homogeneización) a fin de mejorar la demostración de la aglutinación de las
20 partículas sensibilizadas. Como puede verse 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 fluida con el medio de cultivo 62 contenido en la bolsa de homogeneización 10 a través de un conducto 68. A continuación, se puede transferir una fracción del medio de cultivo 62 que contiene la muestra de alimento al tubo 66, en el que tiene lugar
25 la detección. Una transferencia de este tipo se puede conseguir en particular

mediante cambios de temperatura, en base a la ley de los gases perfectos ($PV = nRT$). En el documento WO-A-2004/092401 se describe un procedimiento de este tipo.

En el caso de utilización de partículas magnéticas, la lectura en el
5 recipiente secundario que contiene el medio de reacción al final del período de incubación se lleva a cabo utilizando un lector magnético.

La señal magnética puede ser amplificada por el uso previo de un campo magnético (mediante un imán) que concentra la aglutinación en el centro de la zona de lectura.

10 La aplicación de un campo magnético también puede mejorar el límite de detección cuando este fenómeno desencadena la formación de una aglutinación, después de la agrupación de las partículas magnéticas que han capturado los microorganismos. De hecho, si la concentración de microorganismos no es suficiente para desencadenar la aglutinación pasiva, la
15 agrupación de las partículas magnéticas, algunas de las cuales han capturado previamente los microorganismos, forzará una aglutinación. Además, la repetición de esta secuencia (es decir, la magnetización y resuspensión) también puede amplificar el fenómeno de captura y formación de aglutinación y aumentar así la sensibilidad del análisis.

20 Los ejemplos que se exponen a continuación tienen como objetivo presentar diferentes formas de realización del procedimiento según la invención y los resultados obtenidos. De ninguna manera limitan la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de los electrodos de análisis del biodetector electroquímico.
25

Reactivos:

Perclorato de litio (LiClO_4), cloruro sódico (NaCl), hidróxido sódico (NaOH), hexacianoferrato de potasio (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), hexacianoferrato de potasio (II) trihidrato ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Tween 20, tampón fosfato (BPS),
 5 albúmina de suero bovino (BSA), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido maleico, ADN de salmón y 50X Denhardt procedentes de Sigma-Aldrich.

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

El tampón de hibridación es PBS 0,01 M, NaCl 0,5 M, 2X Denhardt y
 10 ADN de salmón a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

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

El 3-(2-hidroxietil)pirrol o PyOH y el 3-(etanoato de ftalimida)pirrol o
 15 PyNHP son suministrados por EZUS Lyon.

Los oligonucleótidos sintéticos que contienen 20 nucleótidos y que portan un grupo amino en el extremo 5' se fijan covalentemente por sustitución de los grupos NHP.

El monómero funcional es el siguiente:

20 Pyr- $5'$ TTTTTTTTTTGAATCCTCAGTTTTTCAACG $3'$.

El nucleótido complementario porta un grupo biotina en el extremo 5'. Su secuencia es la siguiente: $5'$ CGTTGAAAACTGAGGATTC $3'$.

Biodetector y equipo de detección electroquímica:

Las mediciones de detección electroquímica se llevaron a cabo
 25 utilizando un potencióstato BioLogic controlado por ordenador de Sciences

Instruments.

El detector utilizado se deriva de la tecnología de placa de circuito impreso (PCB). La deposición de oro en los electrodos es una deposición galvánica por electrólisis a partir de un baño a base de oro. Los electrodos
5 están compuestos por una multicapa de resina epoxi, cobre, níquel y oro.

Preparación de los electrodos:

Para lavar los electrodos, la zona de análisis de los detectores se impregna en una solución de agua destilada/etanol 1:1 durante un minuto en un baño de ultrasonidos.

10 Después del lavado, los detectores se limpian y se activan electroquímicamente. Para ello, se deposita en la zona de análisis del detector una gota de 30 μ l de NaOH 0,2 M en agua destilada, para humedecer todos los electrodos. El detector está conectado a un potencióstato y se generan, por cronoamperometría, varios ciclos de salto de potencial en oxidación y en
15 reducción. El objetivo de esta etapa es generar burbujas de oxígeno en la interfaz con los electrodos a fin de eliminar cualquier contaminante orgánico y/o inorgánico. A continuación se aclara el detector con agua destilada.

La superficie de los electrodos de trabajo se modifica por electrodeposición de copolímero. Todos los electrodos están por tanto
20 cubiertos con una gota de la solución de electropolimerización, 100 mM de PyOH y 25 μ M de PyODN (relación de concentración 1/4.000) y LiClO₄ 0,5 M. A continuación, se somete la reacción a electroconducción aplicando un potencial fijo de 0,8 V/pseudorreferencia de oro, generado por cronoamperometría. La polimerización se interrumpe una vez que se alcanza la
25 carga impuesta de 11 mC/cm². El copolímero se forma de manera simultánea

en todos los electrodos de trabajo. A continuación se aclaran los electrodos con agua destilada.

La siguiente etapa consiste en la hibridación. El detector está cubierto con una gota de 30 µl 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 detector se impregna en una solución de estreptavidina a una concentración de 100 µg/ml en tampón PBS durante 15 minutos con agitación. A continuación, se fija la molécula anti-ligando colocando el detector en contacto con una solución de 1 µg/ml de molécula anti-ligando en el tampón TRIS-maleato BSA.

En los siguientes ejemplos, la molécula anti-ligando es una proteína de fago recombinante 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 de alimento

Se incuba un biodetector funcionalizado con proteínas de fago recombinantes específicas para *E. coli* O157, como se ha descrito *supra*, y unido a una bolsa de homogeneización, con una muestra de alimento.

Se incuban dos bolsas que contienen los biodetectores con preparaciones de enriquecimiento positivas. Se incuban dos bolsas que contienen los biodetectores con preparaciones de enriquecimiento negativas, y se incuban dos bolsas que contienen los biodetectores con una preparación de enriquecimiento no contaminada con el fin de medir el ruido de fondo de la matriz de alimento.

Preparación del enriquecimiento positivo

Se colocan asépticamente 25 g de carne cruda que tiene un mínimo de

un 5 % de materia grasa en la bolsa de Stomacher® con un filtro y se ponen en contacto con *E. coli* O157:H7 ATCC 43888. Se coloca la bolsa durante 24 horas a 2 °C-8 °C para someter la cepa a estrés.

5 A continuación se añaden a la muestra 225 ml de agua de peptona tamponada (bioMérieux ref. 42043) precalentada durante 24 horas a 41,5 °C y 5 mM de sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

10 Se verificó previamente el crecimiento de la *E. coli* O157:H7 en presencia de 5 mM de sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Se confirmó que la presencia de esta sonda redox no ralentizaba el crecimiento bacteriano en un medio de cultivo.

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

Este protocolo se repite a fin de someter a ensayo dos suspensiones positivas por medio de dos bolsas que contienen un soporte funcionalizado.

15 Un recuento en una placa de Petri, a partir de dos suspensiones positivas, hizo posible evaluar, antes de la incubación en la bolsa de Stomacher®, una concentración media de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 de 0,92 UFC/g de carne cruda.

A continuación, se incuba la preparación a 41,5 °C durante 3 horas.

20 Preparación de los enriquecimientos negativos

Control negativo: del mismo número de lote de carne cruda, se colocan asépticamente 25 g en una bolsa de Stomacher® con un filtro y se ponen en contacto con *Bacillus cereus* ATCC 27522. Se coloca la bolsa durante 24 horas a 2 °C-8 °C para someter la cepa a estrés.

25 A continuación, se añaden a la muestra 225 ml de agua de peptona

tamponada (bioMérieux ref. 42043) precalentada durante 24 horas a 41,5 °C y 5 mM de sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

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

- 5 Este protocolo se repite a fin de someter a ensayo dos suspensiones negativas por medio de dos bolsas que contienen un soporte funcionalizado.

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

10

A continuación se incuba la preparación a 41,5 °C durante 3 horas.

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

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

Resultados obtenidos:

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

- 20 En la figura 5 se exponen los gráficos de Nyquist ($-\text{Im}(z)$ frente a $\text{Re}(z)$) obtenidos a 200 mV en una escala de frecuencias de entre 1 Hz y 100 kHz.

El espectro de impedancia electroquímica obtenido después de 6 horas de incubación de la preparación de carne cruda en la bolsa de Stomacher® sin contaminación, y la que se obtiene después de 3 horas de incubación de la

- 25 preparación de carne cruda con contaminación negativa presentan la misma

43

resistencia a la transferencia de electrones R_{ct} (diámetro de los semicírculos), los valores son respectivamente iguales a 116 kΩ y 115 kΩ.

La resistencia a la transferencia de electrones se atribuye así al ruido de fondo de la matriz, que es idéntica a la resistencia a la transferencia de electrones durante el crecimiento de las bacterias no diana.

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 la resistencia a la transferencia de electrones es 719 kΩ, es decir, aproximadamente seis veces superior a la obtenida con la contaminación negativa, así que permite la clara detección de *E. coli* O157:H7.

El valor R_{ct} medio obtenido con todas las bolsas de homogeneización, la desviación estándar y los valores del coeficiente de variación, se exponen en la siguiente Tabla 1. Los valores indicados son los valores totales de la resistencia de carga correspondientes al diámetro del semicírculo de la señal de impedancia.

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

Tabla 1

Ejemplo 3: Detección de *Listeria innocua* en una muestra de alimento.

Se incuba un biodetector funcionalizado con fragmentos Fab' específicos para *Listeria*, como se ha descrito *supra*, y unido a una bolsa de homogeneización, con una muestra de alimento.

Se incuba una bolsa que contiene los biodetectores con una preparación de enriquecimiento positiva. Se incuba una bolsa que contiene los biodetectores con una preparación de enriquecimiento negativa.

Preparación del enriquecimiento positivo

Se colocan asépticamente 25 g de carne cruda que tiene un mínimo de un 5 % de materia grasa en una bolsa de Stomacher® con un filtro y se ponen en contacto con *Listeria innocua* ATCC 33090. Se coloca la bolsa durante 22 horas a 2 °C-8 °C para someter las bacterias a estrés.

A continuación se añaden a la muestra 225 ml de caldo Xpress para *Listeria* (bioMérieux, ref. 42626) precalentado durante 18 horas a 30 °C y 5 mM de sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

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

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

Un recuento en una placa de Petri hizo posible evaluar la concentración de *Listeria innocua* ATCC 33090, antes de la incubación en la bolsa de Stomacher®, a una concentración de 0,48 UFC/g de carne cruda.

A continuación se incuba la preparación a 30 °C durante 6 horas.

Preparación del enriquecimiento negativo

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

- 5 A continuación se añaden a la muestra 225 ml de caldo Xpress para *Listeria* (bioMérieux, ref. 42626) precalentado durante 18 horas a 30 °C y 5 mM de sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

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

A continuación se incuba la preparación a 30 °C durante 6 horas.

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

- 15 Resultados obtenidos:

Para cada bolsa, la medición de la impedancia se realizó directamente, sin la etapa de lavado del biodetector.

En la figura 6 se exponen los gráficos de Nyquist ($-\text{Im}(z)$ frente a $\text{Re}(z)$) obtenidos a 200 mV en una escala de frecuencias de entre 1 Hz y 100 kHz.

- 20 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 una concentración de $4,10^7$ UFC/g) (línea discontinua de la Figura 6) muestra que el valor de resistencia a la transferencia de electrones es de 13 kΩ.

- 25 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) (línea continua de la figura 6), el valor de la resistencia a la transferencia de electrones es 45 kΩ, es decir, aproximadamente tres veces superior al obtenido con la contaminación

5 negativa.

Este resultado demuestra claramente que es posible detectar la presencia de bacteria *Listeria innocua* presente en una muestra de alimento con los fragmentos Fab' específicos fijados en un biodetector electroquímico en contacto con un medio de enriquecimiento que contiene dicha muestra sin la

10 etapa de lavado del detector, y sin amplificación de la señal.

El valor R_{ct} medio obtenido con todas las bolsas de homogeneización, la desviación estándar y los valores del coeficiente de variación se exponen en la siguiente Tabla 2. Los valores indicados son la resistencia a la carga total de los valores correspondientes al diámetro del semicírculo de la señal de

15 impedancia.

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

Tabla 2

Ejemplo 4: Elaboración de un soporte de captura sensibilizado con por lo

20 **menos una pareja de unión específica para el microorganismo diana para la detección óptica.**

Un soporte de captura, hecho de poliestireno irradiado, vendido por la empresa Nunc/Thermo Scientific (Nº de Cat. 472230) y que se muestra en las figuras 9 y 10.

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

- 1) el soporte de poliestireno se sumerge a 37 °C durante una noche en una solución biotinilada de 5 µg/ml de BSA (albúmina de suero bovino) en tampón de carbonato a pH 9,6;
- 2) a continuación, se aclara el soporte con un tampón PBS durante varios segundos;
- 3) después del aclarado, se sumerge el soporte a 37 °C durante dos horas en una solución de 10 µg/ml de estreptavidina en tampón fosfato a pH 7,2;
- 4) a continuación se aclara el soporte con un tampón carbonato a pH 9,6 durante varios segundos;
- 5) a continuación se sumerge el soporte 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) finalmente se pasiva el soporte en una solución de BSA en tampón carbonato a pH 9,6, durante dos horas a 37 °C.

El soporte sensibilizado así elaborado se puede utilizar para la detección óptica de los microorganismos o se puede mantener a 2 °C-8 °C para su uso posterior.

Ejemplo 5: Detección óptica de *Escherichia coli* O157:H7 en una muestra de alimento mediante el uso de un soporte sensibilizado.

El objetivo de este experimento es detectar directamente, mediante el uso de un soporte sensibilizado como se ha descrito anteriormente y mostrado en la figura 8, la presencia de la bacteria diana *E. coli* O157:H7 en una muestra de alimento durante el enriquecimiento.

- 5 Como se detalla a continuación, la detección se lleva a cabo 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 de alimento, diluida 1/10⁹ en el medio de reacción.

10 Protocolo:

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

Se preparan cuatro muestras de la siguiente manera:

- Muestra A: en una bolsa de homogeneización, se resuspenden 25 g de carne picada contaminada por 5 unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli* O157:H7 en 225 ml de BPW (bioMérieux, Ref. 42043.) complementada con 0,01 g/l de vancomicina (Sigma, N° de Cat. 75423) y 0,3 g/l de TTC (bioMérieux, Ref. 04568088);
- Muestra B: en una bolsa de homogeneización, se resuspenden 25 g de carne picada no contaminada por *E. coli* O157:H7 en 225 ml de BPW complementada con 0,01 g/l de vancomicina y 0,3 g/l de TTC;
- Muestra C: en una bolsa de homogeneización, se resuspenden 375 g de carne picada contaminada por 5 UFC de *E. coli* O157:H7 en 3.375 ml de BPW complementada con 0,01 g/l de vancomicina y 0,3 g/l de TTC;
- Muestra D: en una bolsa de homogeneización, se resuspenden 375 g de carne picada no contaminada por *E. coli* O157:H7 en 3.375 ml de BPW

complementada con 0,01 g/l de vancomicina y 0,3 g/l de TTC;

Los análisis se llevan a cabo tres veces para cada muestra.

Etapa 2: Inmersión de los soportes sensibilizados en las bolsas de homogeneización antes de la incubación

- 5 El soporte de captura sensibilizado se coloca en cada bolsa de Stomacher (Muestras A, B, C y D), como se describe más adelante. A continuación, se vuelven a cerrar las bolsas de homogeneización por medio de un pasador de cierre y se incuban en una incubadora a 41,5 °C durante 16 a 24 horas.

10 Etapa 3: Lectura de los soportes de captura después del período de incubación

- Al final de la incubación (20 horas a 41,5 °C) y después de la reducción no específica del TTC por todas las bacterias presentes en la muestra (es decir, que pertenecen a la flora anexa y a la flora diana), el medio de reacción es de color rojo. Por último, con el fin de poder observar el soporte de captura
- 15 que pone de manifiesto la positividad o negatividad de la muestra analizada, las bolsas de homogeneización se inclinan con el fin de aislar dicho soporte de captura del medio de reacción.

- De acuerdo con el plan experimental, las muestras B y D son positivas mientras que las muestras A y C son negativas. El análisis de estas mismas
- 20 muestras por el procedimiento VIDAS® ECPT comercializado por el solicitante (ref. 30122) condujo a resultados similares, confirmando así los resultados obtenidos mediante la lectura óptica del soporte de captura sensibilizado.

- Por último, los niveles diana alcanzados después de 20 horas de incubación son de aproximadamente 5,5 log₁₀ UFC/ml para la muestra B y
- 25 3,5 log₁₀ UFC/ml para la muestra D.

Ejemplo 6: Detección óptica de *Listeria spp.* en muestras ambientales mediante el uso de un soporte sensibilizado.

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

Como se detalla a continuación, la detección se lleva a cabo durante el periodo de incubación sumergiendo un soporte de captura como se describe en la figura 10, sensibilizado con tres proteínas recombinantes de fago anti-*Listeria spp.* en un recipiente cerrado que contiene la muestra, diluida en el medio de reacción.

Protocolo:

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

Todas las muestras ambientales se preparan como en el ejemplo que se detalla a continuación;

Se dividen en dos mitades esponjas (8 cm x 3 cm) utilizadas para la toma de muestras de superficie, tratadas de la siguiente manera:

Muestra 1: en un recipiente (es decir, frasco), se contamina artificialmente la primera 1/2 esponja mediante 5 UFC de una cepa perteneciente al género *Listeria* y se resuspende en 45 ml de medio LX (bioMérieux, Ref. 42635) complementado con 0,1 g/l de TTC (bioMérieux, Ref. 04568088);

Muestra 2: en un segundo recipiente (es decir, frasco), se resuspende la otra mitad, que no está contaminado por una cepa perteneciente al género *Listeria*, en 45 ml de medio LX (bioMérieux, Ref. 42635) complementado con

0,1 g/l de TTC (bioMérieux, Ref. 04568088).

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

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

5

Tabla 3

Etapas 2: Inmersión del soporte sensibilizado en el recipiente (frasco) antes de la incubación

Se coloca en cada frasco un soporte sensibilizado, tal como se describe en las figuras 9 y 10. Para ello, se hace un agujero en la tapa del frasco de manera que la soporte de captura sensibilizado 64 pueda insertarse a la fuerza hasta que la zona de análisis (las zonas 641 y 642) quede completamente sumergida en el medio de cultivo. A continuación se cierran los frascos con su tapón y se incuban en una incubadora a 30 °C durante 24 a 48 horas.

15

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

Al final de la incubación (24-48 horas a 30 °C) y después de la reducción no específica del TTC por todas las bacterias presentes en la muestra (es decir, que pertenecen a la flora anexa y a la flora diana), el medio de reacción es de color rojo. También con el fin de poder observar el soporte de captura sensibilizado que pone de manifiesto la positividad o negatividad de la muestra analizada, las bolsas de homogeneización se inclinan a fin de aislar la muestra

20

del medio de reacción. Cada muestra se analiza también mediante el procedimiento VIDAS® LIS (Ref. 30700).

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla 4:

Nº de Muestra	Cepa inoculada	Resultado del biodetector óptico	Resultado del VIDAS LIS
Muest. A1	<i>L. monocytogenes 4b</i> ATCC 19115	+	+
Muest. A2	N/A	-	-
Muest. B1	<i>L. seeligeri NSB 22460</i>	+	+
Muest. B2	N/A	-	-
Muest. C1	<i>L. welshimeri 6a</i>	+	+
Muest. C2	N/A	-	-

5

Tabla 4

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 destacan la positividad de la muestra (véase la figura 10).

10

De acuerdo con el plan experimental, las muestras 1 son positivas, mientras que las muestras 2 frente a los negativos son negativas. El análisis de estas mismas muestras mediante el procedimiento VIDAS LIS condujo a resultados similares, confirmando así los resultados obtenidos mediante la lectura óptica de un soporte de captura sensibilizado.

15

Ejemplo 7: Elaboración de las partículas funcionalizadas (conjugadas) mediante por lo menos una pareja de unión específica para el microorganismo diana.

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

- Preparación por adsorción de la pareja de unión específica (proteína de fago recombinante anti-*E. coli* O157:H7) siguiendo las siguientes etapas:
 1. lavado de las partículas de látex (Plain Hidy blue, Polymer lab) en agua VERSOL por centrifugación;
 - 5 2. adsorción de las parejas de unión específicas a una concentración de 150 µg/ml en tampón fosfato a pH 7 en presencia de las partículas de látex con un contenido de sólidos de un 0,5 % durante 3 horas a temperatura ambiente y con rueda de agitación.
 - 10 Los rendimientos de adsorción son superiores al 80 %, por lo que no es necesario lavar las partículas de látex después de la adsorción.
 - Preparación por acoplamiento de la pareja de unión específica (proteína de fago recombinante anti-O157) siguiendo las siguientes etapas:
 1. lavado de las partículas de látex (Carboxylic Hidy blue, Polymer lab) en agua Versol por centrifugación;
 - 15 2. acoplamiento a clorhidrato de etil-(N',N'-dimetilamino)propilcarbodiimida (EDC) de 125 µg/ml de estreptavidina en tampón fosfato 20 mM a pH 7 en presencia de las partículas de látex con un contenido de sólidos del 0,5 % por agitación en un termomezclador a 37 °C y 700 rpm durante 3 horas;
 - 20 3. la estreptavidina no acoplada se elimina mediante 20 minutos de centrifugación a 5.000 g y el resto se retoma de nuevo en tampón Tris 20 mM a pH 7;
 - 25 4. adición de los 150 µg/ml de la pareja de unión específica

biotinilada (proteína de fago recombinante biotinilada anti-*E. coli* O157:H7) e incubación durante 3 horas a temperatura ambiente con rueda de agitación;

5. eliminación del exceso de pareja de unión por centrifugación durante 10 minutos a 7.000 g y recogida de nuevo en tampón Tris 20 mM a pH 7.

Ejemplo 8: Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de alimento por la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas en medio líquido.

- 10 El objetivo de este experimento es detectar directamente, por la aglutinación de partículas de látex azul sensibilizadas tales como las descritas en el ejemplo anterior, la presencia de la bacteria diana *E. coli* O157:H7 en una muestra de alimento durante el enriquecimiento.

- 15 Como se detalla a continuación, la detección se lleva a cabo durante el periodo de incubación por inmersión de las partículas de látex azul sensibilizadas con una proteína de fago recombinante anti-*E. coli* O157:H7, en el recipiente cerrado que contiene la muestra de alimento, diluida en el medio de enriquecimiento.

Protocolo:

- 20 Etapa 1: resuspension/dilución de las muestras en el medio de enriquecimiento

Se preparan seis muestras de la siguiente manera:

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

- 25 Muestra A2: en una bolsa de homogeneización, se diluyen 25 ml de



leche pasteurizada no contaminada por *E. coli* O157:H7 en 225 ml de BPW;

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

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

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

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

10 Se llevaron a cabo tres repeticiones para cada muestra.

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

De acuerdo con la figura 11, a continuación se añade a la bolsa de homogeneización un tubo que contiene el medio de reacción. El medio de reacción se compone de 100 µl de partículas de látex azul sensibilizadas y 1,4 ml de BPW complementada con 10 mg/l de vancomicina.

Las bolsas de homogeneización se vuelven a cerrar por medio de un pasador de cierre y se colocan en una incubadora programable para una incubación en tres fases. De hecho, la transferencia de una alícuota de la muestra (0,5 ml) de la bolsa de homogeneización al tubo que contiene el medio de reacción se realiza de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO-A-2004/092401, en base a la ley de los gases perfectos ($pV = nRT$).

El período de incubación se divide de la siguiente manera:

25 Fase 1: 16 horas a 41,5 °C; enriquecimiento de la muestra de 25 g

diluida en BPW,

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

5 Fase 3: 8 horas a 1,5 °C; enriquecimiento del medio de reacción que contiene la alícuota de 0,5 ml,

De acuerdo con el plan experimental, las muestras Muest. N° 1 se determinaron como positivas frente a las negativas para las muestras Muest. N° 2. El análisis de estas mismas muestras mediante el procedimiento VIDAS ECPT condujo a resultados similares, confirmando así los resultados obtenidos
10 por la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas en medio líquido.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de por lo menos un microorganismo presente en una muestra colocada en un recipiente cerrado, comprendiendo
 5 esencialmente dicho procedimiento las siguientes etapas:
 - a) Colocar dicha muestra en contacto en el recipiente con por lo menos un medio de cultivo y un soporte capaz de capturar el microorganismo o los microorganismos a detectar,
 - b) Cerrar el recipiente,
 - 10 c) Colocar el recipiente en condiciones capaces de permitir el crecimiento del microorganismo o de los microorganismos
 - d) Detectar, dentro de dicho recipiente cerrado, utilizando un medio de detección, la presencia del microorganismo o de los microorganismos fijados sobre el soporte de captura.
- 15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que un sistema indicador de presencia capaz de permitir la detección se pone en contacto en el recipiente durante la etapa a).
- 20 3. El procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, que incluye una etapa intermedia c') que consiste en la transferencia de toda la mezcla, o parte de ella, constituida por dicha muestra, el medio de cultivo, el soporte capaz de capturar el microorganismo o los microorganismos a detectar, y potencialmente del sistema indicador de presencia desde el recipiente, en
 25 este caso denominado recipiente principal, a por lo menos un segundo

recipiente denominado recipiente secundario.

4. El procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, que incluye una etapa adicional e) que consiste en confirmar la detección del
5 microorganismo o de los microorganismos detectados.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la etapa de confirmación e) se logra utilizando un medio de detección que es idéntico o diferente al medio de detección utilizado para la etapa de detección.

10

6. El procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de detección se toma del grupo que comprende: medios de detección eléctricos, en concreto, medios de detección electroquímicos, medios de detección ópticos, medios de detección acústicos,
15 medios de detección térmicos, medios de detección mecánicos y medios de detección magnéticos.

7. El procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte para la captura del microorganismo o de los microorganismos
20 también constituye el medio de detección.

8. El procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos una pareja de unión específica o no específica del microorganismo o de los microorganismos se fija sobre el
25 soporte de captura.

9. El procedimiento de detección según la reivindicación anterior, en el que la pareja de unión específica se toma del grupo que comprende: anticuerpos, fragmentos Fab, fragmentos Fab', proteínas de fago recombinantes o no recombinantes, y fagos.

5

10. El procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección del microorganismo o de los microorganismos se realiza en tiempo real.

10 11. El procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección del microorganismo o de los microorganismos se realiza después de la etapa de crecimiento de dicho microorganismo o microorganismos.

15 12. El procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el recipiente es una bolsa de homogeneización, un matraz, una botella o un frasco.

20 13. EL procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte de captura es un soporte particulado o de una sola pieza.

14. El procedimiento según la reivindicación anterior, en el que el soporte particulado está constituido por partículas sensibilizadas.

25 15. EL procedimiento según la reivindicación anterior, en el que las

partículas sensibilizadas son magnéticas.

16. El procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de detección está conectado a un sistema de
5 análisis de datos.

17. El procedimiento de detección según la reivindicación 16, en el que la conexión entre el soporte de captura o el medio de detección y el dispositivo de análisis de datos es una conexión por cable o una conexión inalámbrica.

RESUMEN

PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DIRECTA E IDENTIFICACIÓN DE UN MICROORGANISMO EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA DILUIDA EN UN 5 CALDO DE ENRIQUECIMIENTO

La presente invención se refiere en general al campo del análisis, por ejemplo, al análisis biológico. Más concretamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de por lo menos un microorganismo presente en una muestra colocada en un recipiente cerrado, comprendiendo esencialmente dicho procedimiento las siguientes etapas:

- 10 a) Colocar dicha muestra en contacto en el recipiente con por lo menos un medio de cultivo y un soporte capaz de capturar el microorganismo o los microorganismos a detectar,
- 15 b) Cerrar el recipiente,
- c) Colocar el recipiente en condiciones capaces de permitir el crecimiento del microorganismo o de los microorganismos,
- d) Detectar, dentro de dicho recipiente cerrado, utilizando un medio de detección, la presencia del microorganismo o de los microorganismos
20 fijados sobre el soporte de captura.

62

1/8

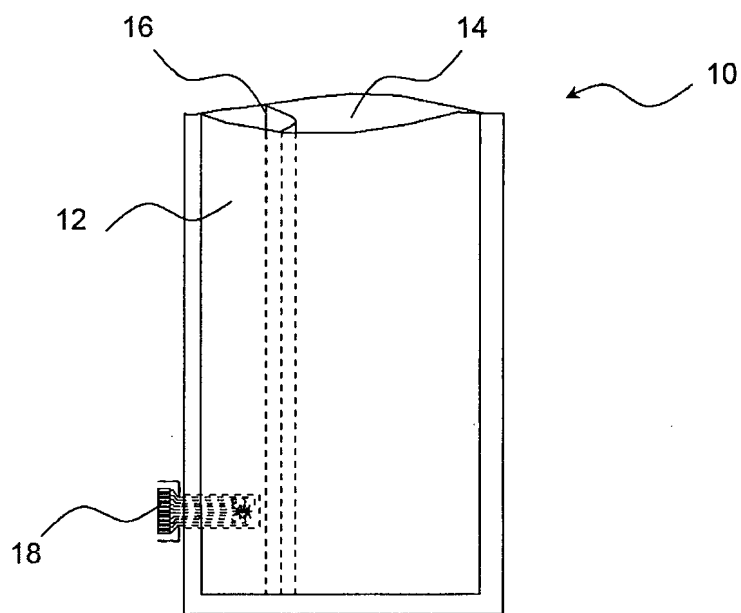


Fig. 1

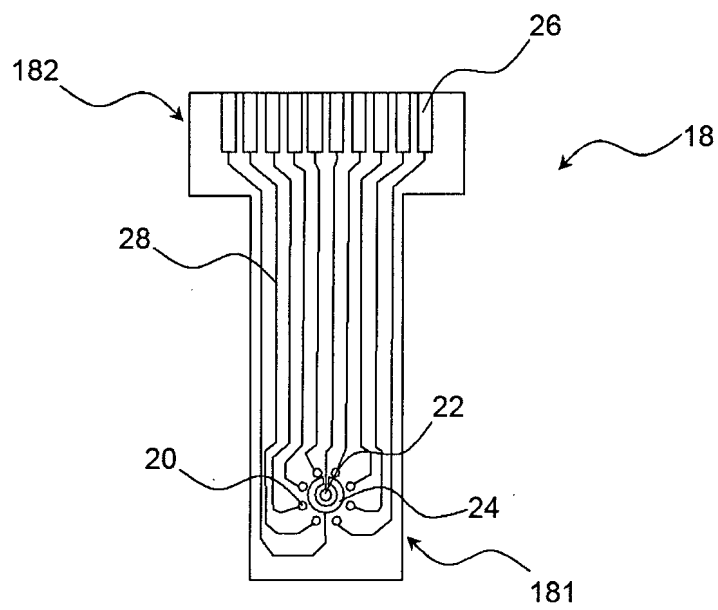


Fig. 2

2/8

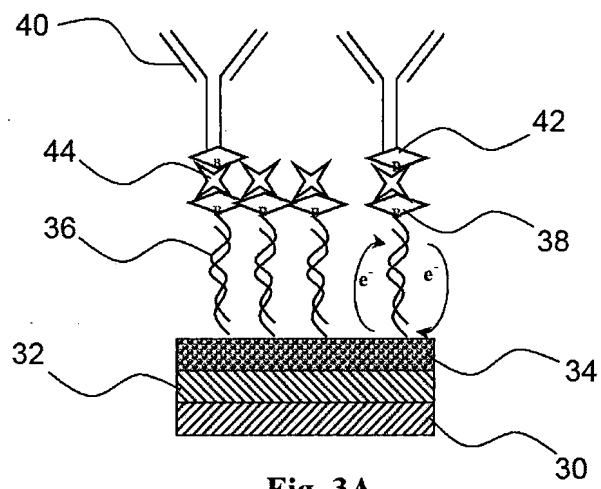


Fig. 3A

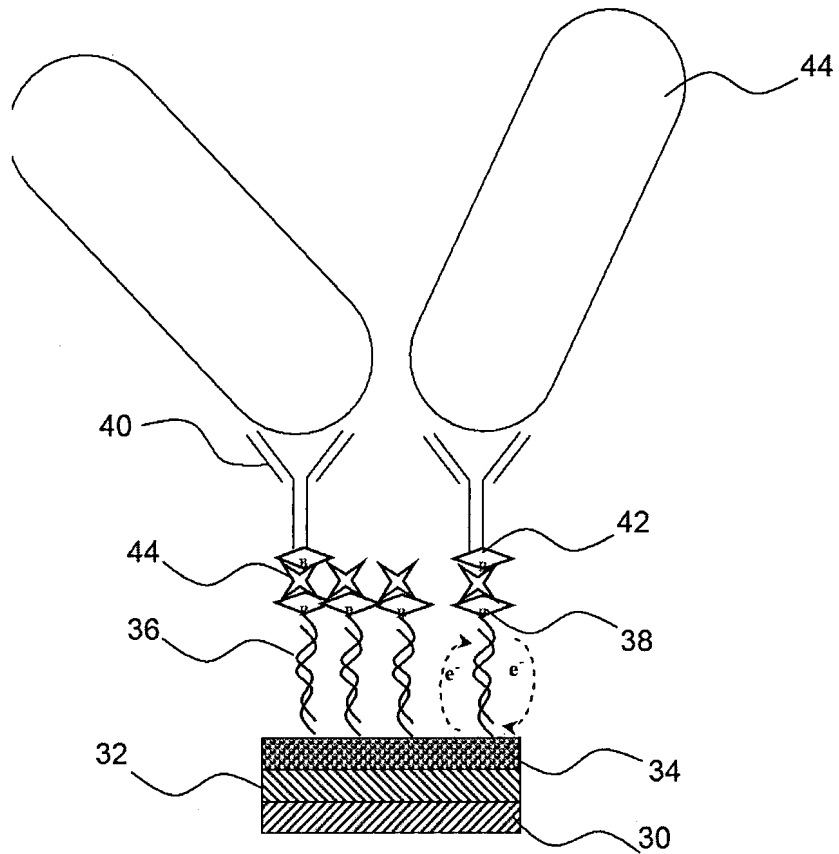


Fig. 3B

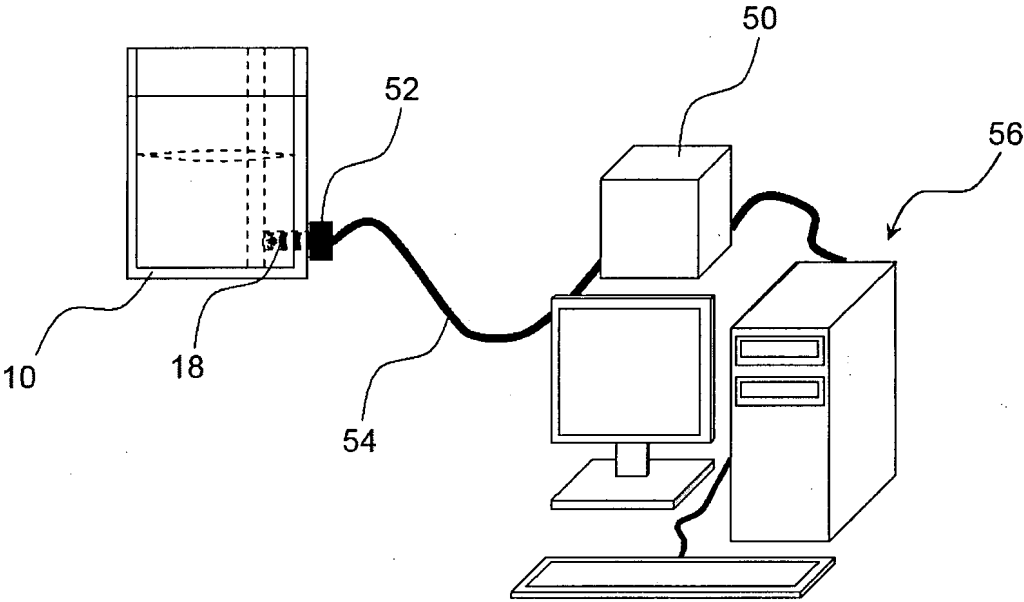


Fig. 4

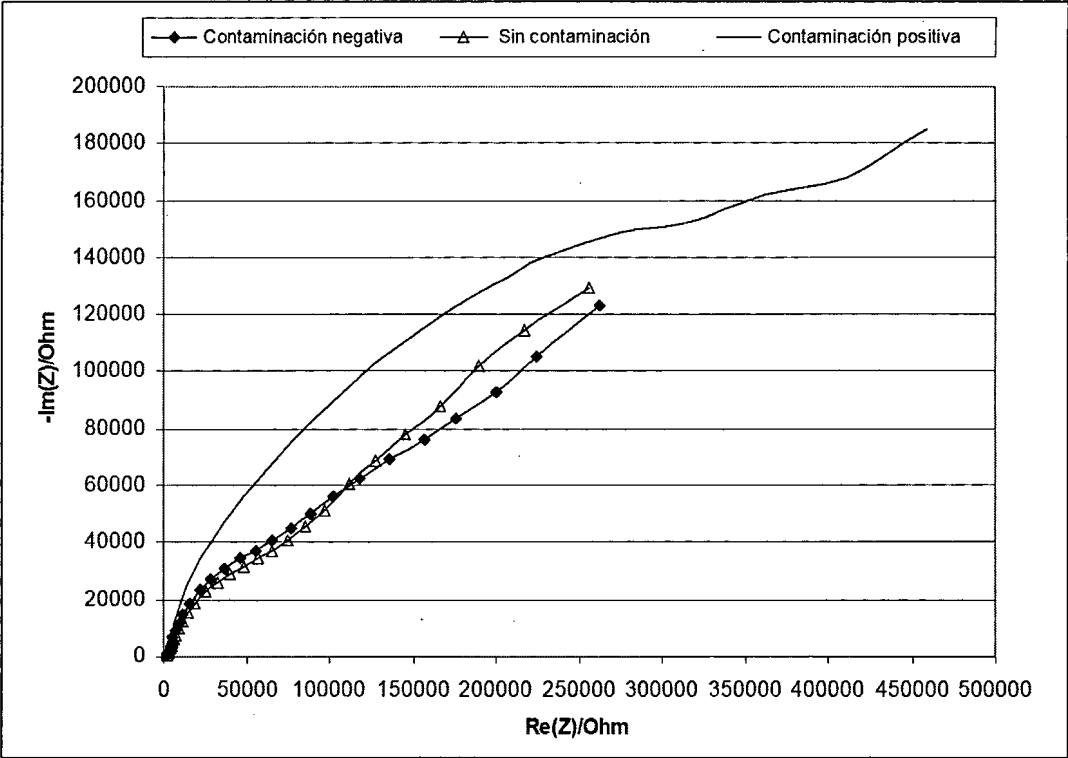


Fig. 5

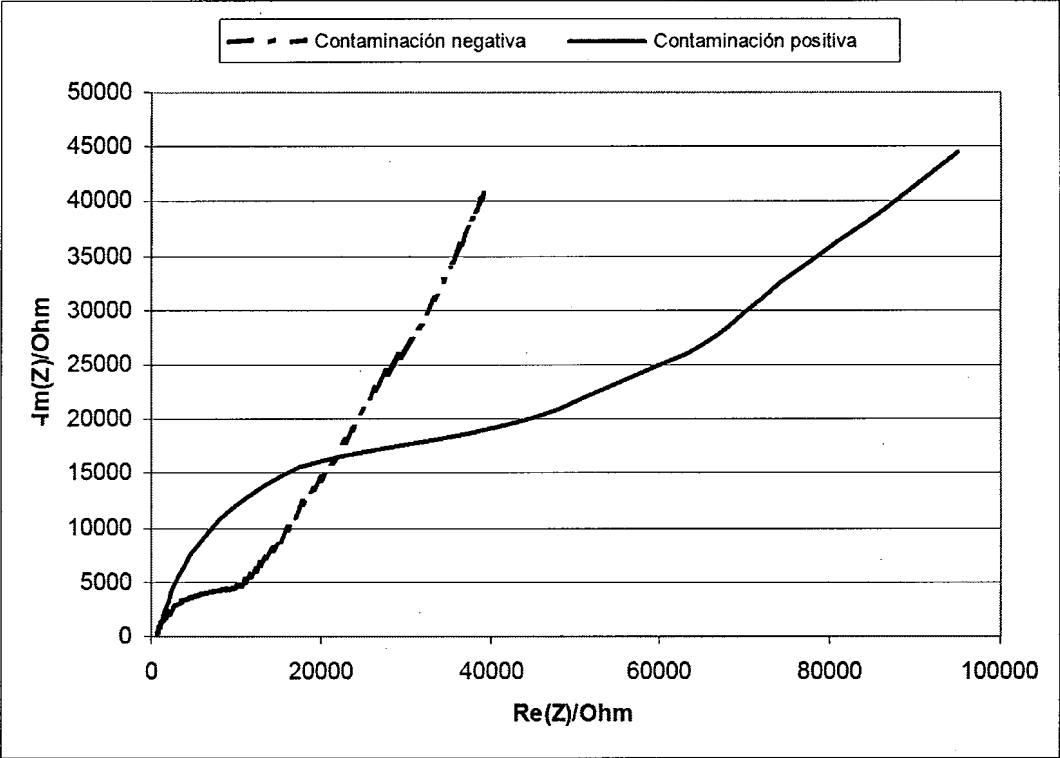


Fig. 6

8

54

6/8

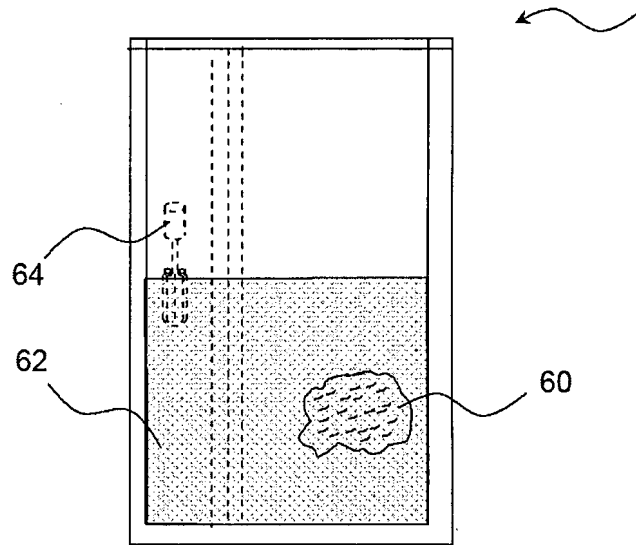


Fig. 7

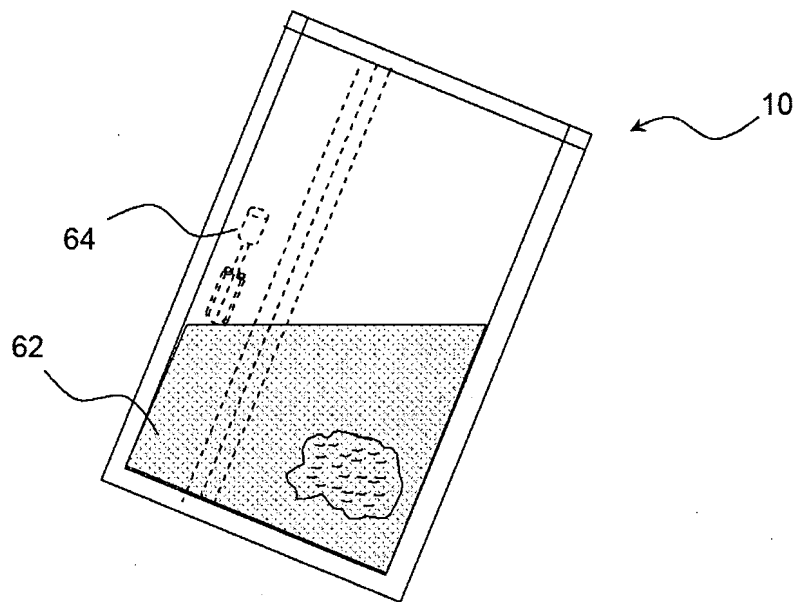


Fig. 8

55

7/8

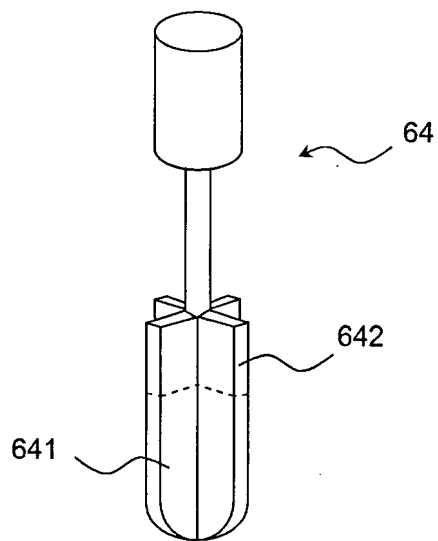


Fig. 9

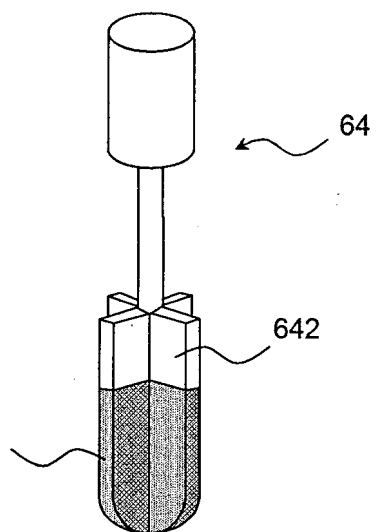


Fig. 10

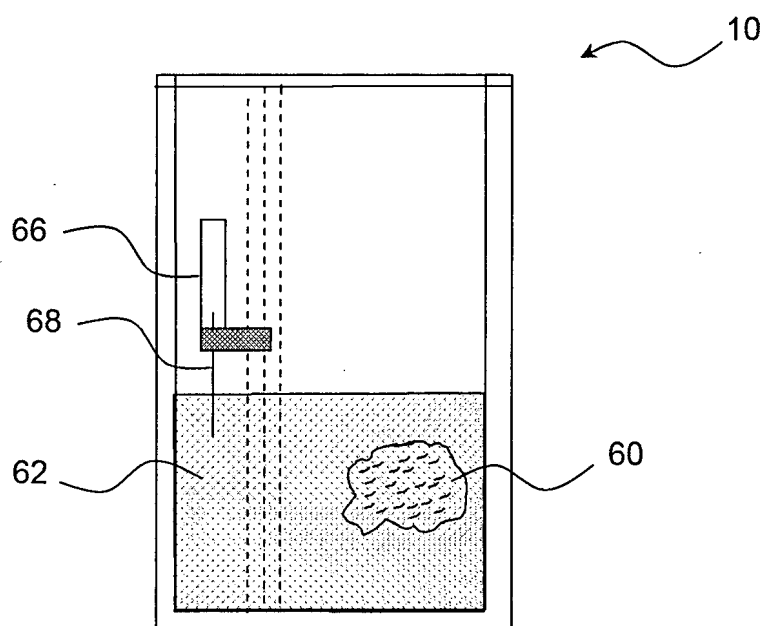


Fig. 11

28

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0011694
		Bogotá D.C., Febrero 06 de 2013 - 11:12:18

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA					NI 800.020.909
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	8316	28/01/2013		90.000.00
RECIBO DE CA	999999999	8317	28/01/2013		90.000.00
RECIBO DE CA	999999999	113449	30/10/2012		30.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
7 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	210.000.00
			\$210.000.00

SON: **DOSCIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. PC11 FR 2011 1031624

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-024077- -00000-0000

Fecha: 2013-02-06 14:26:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 74

28

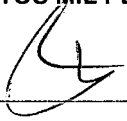
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 004794
		Bogotá D.C., Enero 17 de 2013 - 13:04:57

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA					NI 800.020.909
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	532921222	17/01/2013	7.338.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. PC1/FR2011/051624

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-024077- -00000-0000

Fecha: 2013-02-06 14:26:15 Dep. 2020 DIR NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 74



22

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl:	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) BIOMÉRIEUX	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	1055574	08/07/2010	FR
	P200930716	22/09/2009	ES
		(72) Inventor(es) ATRACHE, Vincent; COLIN, Bruno; LAFAY, Aurelie; MAKROUF, Bouchra MONTES, Pascal; MOSTICONE, David; RAYMOND, Jean Claude; SOFIA, Thierry; VIMONT, Antoine	
		(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 08/02/2013		(87) Publicación Internacional	
Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha (dd/mm/aa)	
Fecha de presentación de la solicitud: 07/07/2011		12/01/2012	
No. de solicitud PCT/FR2011/051624		N° publicación: WO2012/004540 A1	
(54) Título: PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DIRECTA E IDENTIFICACIÓN DE UN MICROORGANISMO EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA DILUIDA EN UN CALDO DE ENRIQUECIMIENTO			

Resumen:

La presente invención se refiere en general al campo del análisis, por ejemplo, al análisis biológico. Más concretamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de por lo menos un microorganismo presente en una muestra colocada en un recipiente cerrado, comprendiendo esencialmente dicho procedimiento las siguientes etapas:

- a) Colocar dicha muestra en contacto en el recipiente con por lo menos un medio de cultivo y un soporte capaz de capturar el microorganismo o los microorganismos a detectar,
- b) Cerrar el recipiente,
- c) Colocar el recipiente en condiciones capaces de permitir el crecimiento del microorganismo o de los microorganismos,
- d) Detectar, dentro de dicho recipiente cerrado, utilizando un medio de detección, la presencia del microorganismo o de los microorganismos fijados sobre el soporte de captura

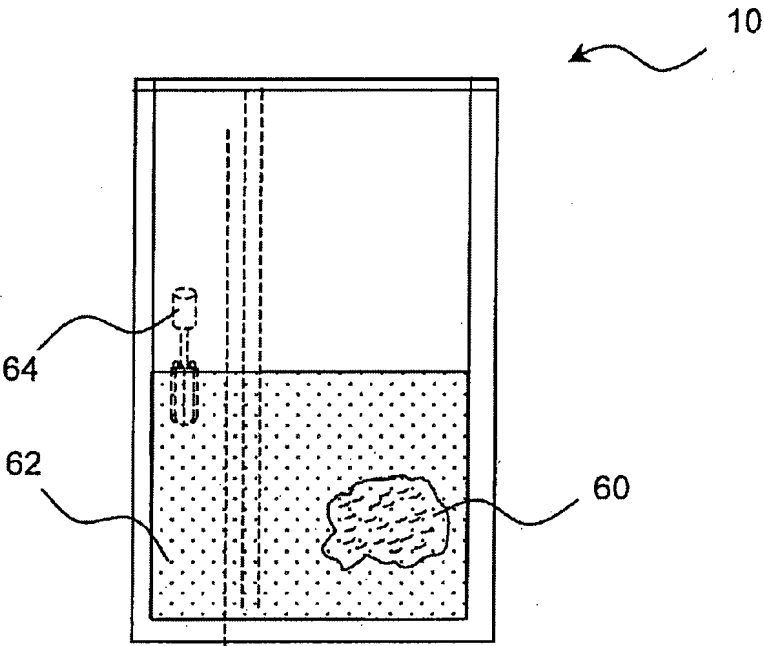


Fig. 7



No. 13-024077- -00000-0000

Fecha: 2013-02-06 14:26:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 74

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art.33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐