

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 COURBEVOIE

(11) Nº de publication :
 (à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

3 050 461

(21) Nº d'enregistrement national :

17 53439

(51) Int Cl⁸ : **C 12 Q 1/04** (2017.01), C 12 Q 1/18, 1/68, C 12 M 1/
 02, 1/34, A 61 J 1/00

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 20.04.17.
 (30) Priorité : 21.04.16 GB 1606991.6; 13.10.16 GB
 1617353.6; 21.04.16 IB WOEP2016058952.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
 demande : 27.10.17 Bulletin 17/43.
 (56) Liste des documents cités dans le rapport de
 recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été
 établi à la date de publication de la demande.
 (60) Références à d'autres documents nationaux
 apparentés :

Demande(s) d'extension :

(71) Demandeur(s) : Q-LINEA AB — SE.

(72) Inventeur(s) : JARVIUS JONAS, LIND ANDERS,
 SODERSTROM HENRIK et GRAWE JAN.

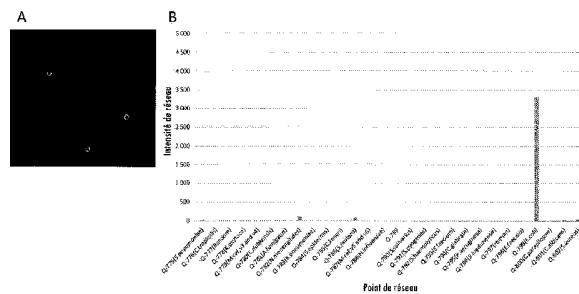
(73) Titulaire(s) : Q-LINEA AB.

(74) Mandataire(s) : CABINET FEDIT LORIOT.

(54) DETECTION ET CARACTERISATION D'UN MICROORGANISME.

(57) Un procédé pour la détection et la caractérisation d'un microorganisme dans un échantillon clinique comprend l'introduction d'un échantillon clinique dans un premier récipient de culture, puis le transport et l'incubation simultanées de l'échantillon clinique dans un compartiment (3) isolé thermiquement d'un conteneur (1) pouvant être scellé. Une aliquote de test est retirée à partir de l'échantillon et le reste de l'échantillon est encore cultivé. Le procédé comprend en outre le retrait de l'ADN à partir de ladite aliquote de test et la réalisation de tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme. Les tests d'acide nucléique sont réalisés à l'aide de: i) une ou plusieurs sondes et/ou amores d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné; et ii) une ou plusieurs sondes et/ou amores d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléoti-

dique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne.



DETECTION ET CARACTERISATION D'UN MICROORGANISME

La présente invention concerne un procédé et un système pour l'identification d'un microorganisme pathologique et une détermination de son profil de susceptibilité antimicrobienne.

Les infections microbiennes représentent une classe majeure de maladie humaine et animale ayant des implications cliniques et économiques significatives. Alors que diverses classes et divers types d'agents antimicrobiens sont disponibles pour traiter et/ou prévenir les infections microbiennes, la résistance antimicrobienne est un problème important et croissant en médecine moderne. Les nombres de souches résistantes aux antimicrobiens de divers pathogènes microbiens ont proliféré dans les 20 dernières années, et les microorganismes continuent à développer une résistance à un nombre croissant de classes d'antimicrobiens, en particulier d'antibiotiques. Avec la propagation des mécanismes de résistance à davantage d'organismes, on prévoit que l'impact sur la santé publique et les coûts associés à la résistance antimicrobienne vont augmenter rapidement dans les années à venir. Dans le contexte d'un traitement d'une infection microbienne, il peut par conséquent être souhaitable, et en effet important, d'avoir des informations concernant la nature du microorganisme infectieux et son profil de susceptibilité antimicrobienne afin d'à la fois assurer un traitement efficace et également réduire l'utilisation d'antibiotiques non nécessaires ou inefficaces et par conséquent aider à contrôler la propagation de la résistance à un antibiotique, ou plus généralement à un antimicrobien. Ceci est particulièrement ainsi le cas d'infections sérieuses

ou potentiellement mortelles pour lesquels un traitement efficace rapide est vital.

La septicémie, une inflammation corporelle généralisée potentiellement fatale provoquée par une infection sévère est l'état le plus coûteux et générateur de coûts hospitaliers aux Etats-Unis d'Amérique, comprenant 5 % du coût hospitalier national total. La mortalité augmente de 7 % chaque heure pour une septicémie sévère, si elle n'est pas traitée de façon adéquate, et la prévalence croissante de souches provoquant une septicémie résistantes aux antimicrobiens rend les prédictions du traitement correct pour la septicémie de plus en plus difficiles. La norme de référence actuelle pour le diagnostic des microorganismes provoquant la septicémie repose sur des techniques d'identification phénotypique et biochimique qui nécessitent l'isolement et la culture de cultures pures des microorganismes infectieux. Cela peut prendre plusieurs jours pour réaliser les tests d'identification microbienne (ID) et de susceptibilité aux antibiotiques (AST) pour identifier l'infection et déterminer le profil de susceptibilité des microorganismes résistants aux antimicrobiens. La pratique clinique actuelle requiert le traitement par un antibiotique à large spectre dans 1 heure suivant la suspicion de septicémie sur la base de symptômes cliniques. Une seconde dose est requise dans les 6-8 heures et cette administration est poursuivie toutes les six à huit heures jusqu'à ce que l'identification du microorganisme et sa susceptibilité antibiotique (ID/AST) soient établies.

30

En raison de l'état létal de la septicémie, les médecins sont réticents à changer le traitement à partir d'antibiotiques à large spectre initialement si le patient

présente une réponse clinique jusqu'à ce que la nature de l'infection microbienne soit déterminée et la susceptibilité antimicrobienne établie. Ceci, à son tour, conduit à l'utilisation élevée non nécessaire d'antibiotiques à large spectre, qui à leur tour alimentent la croissance de la résistance antimicrobienne parmi les microorganismes.

Les états médicaux provoqués par les agents microbiologiques sont généralement diagnostiqués par l'intermédiaire du test d'un échantillon prélevé à partir d'un patient. Un objectif clé (en particulier avec des états potentiellement mortels ayant une vitesse de progression rapide, tels que la septicémie) est de faire analyser l'échantillon aussi rapidement que possible, de telle sorte que le microbe peut être identifié et une augmentation de la résistance antimicrobienne parmi les microorganismes.

Des procédés de test classiques utilisent des mesures de trouble ou la diffusion sur disque pour évaluer l'effet des agents antimicrobiens sur la croissance des microorganismes, et des techniques biochimiques et microbiologiques traditionnelles pour identifier un microorganisme. Ces techniques peuvent prendre plusieurs jours pour identifier et caractériser un microorganisme dans un échantillon clinique, en raison de l'exigence pour des périodes prolongées d'incubation afin de permettre la croissance microbienne. Il y a par conséquent une exigence en matière de techniques qui peuvent rapidement identifier les microorganismes et déterminer le profil de susceptibilité antimicrobienne de microorganismes résistants aux antimicrobiens, et diverses techniques différentes qui réduisent le temps entre la collecte d'échantillons et le diagnostic ont récemment été développées.

Des procédés d'enrichissement de microorganismes dans un échantillon clinique qui contournent l'exigence pour de longues périodes d'incubation sont décrits dans 5 US 8 481 265 ; les cellules microbiennes peuvent être enrichies à partir d'échantillons cliniques par la lyse sélective de cellules non microbiennes, enrichissant la concentration en cellules microbiennes dans un échantillon et contournant l'exigence pour une incubation prolongée avant de 10 tester un échantillon.

Des procédés d'identification microbienne rapide sont décrits dans US 2010/0124763, dans lequel des cultures microbiennes sont enrichies et des microorganismes identifiés 15 par spectroscopie.

Des techniques de test de susceptibilité rapides à l'aide de la cytométrie de flux (Broeren et al. 2013 Clin Microbiol Infect 19, 286-291) et une microscopie automatisée 20 (Price et al. 2014 JMM. 98 50-59) ont été développées pour réduire le temps requis pour l'incubation avant que la susceptibilité ne soit déterminée. La PCR quantitative d'ADN microbien a également été utilisée comme mesure pour la croissance microbienne pour déterminer la susceptibilité 25 antimicrobienne, telle que décrite dans US 5 789 173.

Des procédés d'identification de microorganismes et de test de susceptibilité combinés ont également été développés. Est décrit dans US 2005/0095665-A1 un système 30 dans lequel des panels de milieux de croissance sélectionnés et de substrats chromogéniques et fluorogéniques sont utilisés en combinaison avec une mesure turbimétrique de la croissance microbienne dans un format de puits de micro-

- 5 -

titration automatisé pour identifier des microorganismes et déterminer la susceptibilité antimicrobienne. Des procédés de microscopie automatisés ont également été développés (Metzger et al. 2014 Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 79 5 160-165). Le système BD Phoenix TM permet également l'identification et la caractérisation simultanées rapides de microorganismes, et utilise une diversité de substrats chromogéniques et fluorogéniques pour identifier des microorganismes dans un échantillon et une croissance 10 microbienne mineure pour déterminer la susceptibilité antimicrobienne de microorganismes dans un échantillon.

Des procédés d'identification de microorganismes et de test de susceptibilité combinés supplémentaires et des 15 dispositifs associés sont décrits dans la demande détenue en commun et co-pendante du Demandeur, WO2015/189390. Une partie d'un échantillon clinique est testée pour la présence d'un microorganisme par l'intermédiaire de procédés d'identification microbienne à base moléculaire, qui sont réalisés alors que l'échantillon clinique est mis en culture 20 pour permettre à la croissance microbienne d'avoir lieu. Une fois qu'un microorganisme est identifié, un essai de test de susceptibilité antimicrobienne (AST) peut être réalisé sur l'échantillon clinique en culture afin de déterminer la 25 susceptibilité du microorganisme à un ou plusieurs agents antimicrobiens. Ainsi, l'identification rapide de l'agent responsable de la septicémie et les informations sur sa susceptibilité vis-à-vis des agents antimicrobiens peuvent rapidement et efficacement être établies.

30

Cependant, malgré ces avancées dans le traitement d'échantillons cliniques, il reste des retards inutiles dans

le traitement d'échantillons cliniques, qui entravent les efforts de diagnostic.

5 Selon un premier aspect de la présente invention, il est proposé un procédé pour détecter et caractériser un microorganisme dans un échantillon clinique, ledit procédé comprenant :

a) introduire un échantillon clinique dans un premier récipient de culture contenant un milieu de culture ;

10 b (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du premier récipient de culture dans un compartiment isolé thermiquement d'un conteneur pouvant être scellé et le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour une préculture de l'échantillon, le compartiment isolé thermiquement et le chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver 15 l'échantillon clinique ;

b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit premier récipient de culture ;

25 b (iii)) facultativement retirer une partie de la culture d'échantillon clinique à partir dudit premier récipient de culture et introduire ladite partie dans un second récipient de culture contenant un milieu de culture, et facultativement précultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

30 c) retirer une aliquote de test à partir du premier et/ou second récipient de culture, et continuer à cultiver ledit échantillon clinique et/ou ladite partie dans ledit premier et/ou second récipient de culture ;

et séparer l'ADN à partir de l'Aliquote de test et réaliser des tests d'acide nucléique sur l'ADN pour identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans le microorganisme, et/ou déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique.

En effet, dans n'importe lequel des modes de réalisation de cet aspect de la présente invention, les tests ID et/ou AST (par exemple d'autres tests ID et/ou AST), qu'ils soient classiques ou non, peuvent être réalisés sur l'échantillon ou partie en culture. Le procédé permet par conséquent à la culture de l'échantillon clinique ou de la partie d'avoir lieu pour permettre à des tests d'identification et/ou AST supplémentaires d'être réalisés, par exemple simplement pour fournir un résultat supplémentaire, par exemple comme sauvegarde ou confirmation. Dans un autre mode de réalisation, d'autres tests (par exemple classiques) peuvent être réalisés que l'identité et/ou la susceptibilité antimicrobienne du microorganisme soient déterminées ou non. Dans un aspect préféré, la culture de l'échantillon clinique (à savoir du premier récipient de culture) est continuée pour permettre à d'autres tests d'identification microbienne et de susceptibilité antimicrobienne d'être réalisés.

Il sera en outre entendu que l'identification et/ou la détermination AST peuvent être réalisées une ou plusieurs fois. A savoir, des aliquotes peuvent être retirées de la première ou de la seconde culture une ou plusieurs fois, par exemple à des intervalles, de sorte qu'un test d'ID et/ou AST

peut être réalisé une ou plusieurs fois (par exemple au moins deux fois, par exemple 2 ou 3 fois).

5 Comme indiqué ci-dessus, la culture de l'échantillon clinique dans le premier récipient de culture peut être continuée, alors qu'un test AST est en cours, et facultativement également après que le test a été réalisé. Ainsi, la possibilité existe de répéter le test AST ou de continuer la culture davantage pour permettre un test 10 classique. Comme il est clair à partir du contexte, une aliquote de l'échantillon clinique en culture ou partie retirée à partir de celui-ci dans le premier ou second récipient de culture est simplement une partie, à savoir une partie ou une fraction du contenu du récipient de culture.

15 L'aliquote peut être retirée et utilisée directement pour un test d'ID et/ou AST, ou elle peut être soumise à une période de culture avant de réaliser de tels tests. En outre, une aliquote de test retirée à partir du premier ou second récipient de culture peut être divisée en sous-aliquotes ou 20 fractions d'aliquote, ou un sous-aliquote ou fraction peut être retirée à partir de celle-ci, lesquelles peuvent être soumises au test ou à une culture additionnelle. Cette culture d'une aliquote de test retirée ou fraction d'aliquote retirée peut être réalisée séparément, ou indépendamment, de 25 la culture ou de la culture continuée de l'échantillon clinique dans le récipient de culture.

Selon n'importe lequel des modes de réalisation du premier aspect de la présente invention exposée ci-dessus, 30 les tests d'acide nucléique peuvent être effectués à l'aide de :

i) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde

ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et/ou

5 ii) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique
10 représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne.

Dans un autre mode de réalisation, le procédé comprend la mise en œuvre d'un test de susceptibilité antimicrobienne sur un échantillon clinique en culture obtenu à partir du premier récipient de culture après la culture continuée, la croissance microbienne dans le test de susceptibilité antimicrobienne étant surveillée par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la
20 croissance.

Dans encore un autre mode de réalisation, si un microorganisme est identifié dans les tests d'acide nucléique, réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne
25 sur ledit échantillon clinique en culture et/ou une partie provenant d'étape (c) après la culture continuée, la croissance microbienne dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant surveillée par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et
30 la concentration d'agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés dans le test d'acide nucléique, et

facultativement continuer la culture dudit échantillon clinique et/ou de ladite partie dans ledit premier récipient de culture et/ou second récipient de culture.

5 Ainsi, selon un autre aspect de la présente invention, il est proposé un procédé de détection et de caractérisation d'un microorganisme dans un échantillon clinique, ledit procédé comprenant :

10 a) introduire un échantillon clinique dans un premier récipient de culture contenant un milieu de culture ;

15 b (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du premier récipient de culture dans un compartiment isolé thermiquement d'un conteneur pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon, le compartiment isolé thermiquement et le chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport
20 de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver l'échantillon clinique ;

 b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit premier récipient de culture ;

25 b (iii)) facultativement retirer une partie de la culture d'échantillon clinique à partir dudit premier récipient de culture, et introduire ladite partie dans un second récipient de culture contenant un milieu de culture, et facultativement précultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

 c) retirer une aliquote de test à partir dudit premier et/ou second récipient de culture, et continuer à

cultiver ledit échantillon clinique et/ou ladite partie dans ledit premier et/ou second récipient de culture ;

d) séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test ;

5 e) réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, lesdits tests d'acide nucléique étant réalisés à l'aide de :

10 i) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est 15 identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant 20 capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes et/ou amorces se sont hybrides ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont été 25 étendues ou non (par exemple une réaction d'amplification a eu lieu) ; et

f) si un microorganisme est identifié dans l'étape (e), réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ledit échantillon clinique cultivé et/ou ladite partie provenant de l'étape (c), la croissance microbienne dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant surveillée par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la concentration d'agents

5 antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés dans l'étape (e), et facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique et/ou ladite partie dans ledit premier récipient de culture et/ou second récipient de culture.

10 Les inventeurs ont fait la constatation non évidente que, pour certains systèmes de diagnostic, tels que ceux décrits dans WO 2015/189390, la préculture de l'échantillon clinique comprenant le microorganisme avec chauffage et facultativement agitation avant qu'il ne soit introduit dans un système de diagnostic peut être avantageuse, étant donné que ceci permet à la quantité de temps requise pour l'incubation d'un échantillon dans le système d'être réduite, permettant ainsi au test d'échantillon d'être réalisé plus tôt. En particulier, il y a souvent un long délai du moment auquel l'échantillon (par exemple, sang) est prélevé à partir d'un patient au moment où l'échantillon est placé dans une armoire de culture automatisée dans le laboratoire de microbiologie. Les échantillons de sang sont typiquement collectés, transportés et mis en culture dans l'armoire de culture dans des flacons 15 de culture de sang (des flacons de culture de sang). Des exemples de flacons de culture de sang sont BacT/Alert® (Biomerieux), Bactec™ (Becton Dickinson) et VersaTrek® (Thermo Fisher).

20

25

30 Typiquement, des procédés de détection d'un microorganisme dans un échantillon reposent sur la détection de différences dans le nombre de cellules microbiennes présent dans un échantillon à au moins deux moments, et

reposent ainsi sur la mesure de la croissance microbienne au cours de la « phase logarithmique » de la croissance. La préculture a par conséquent typiquement été évitée dans l'état de la technique, puisqu'il y a un risque de générer un résultat faux négatif pour la croissance microbienne dans certains dispositifs de culture dans des cas où la croissance microbienne a eu lieu avant que l'échantillon ne soit placé dans une armoire de culture automatisée (à savoir la préculture), par exemple si la population de cellules microbiennes a atteint la « phase stationnaire » de la croissance. Pour cette raison, les échantillons sont généralement transportés au laboratoire de microbiologie dans des conteneurs (qui peuvent être isolés) qui soit sont maintenus à la température ambiante, soit sont refroidis jusqu'à au-dessous de la température ambiante. Cependant, la préculture est acceptable si l'analyse n'est pas dépendante d'une détermination positive de la croissance microbienne, à savoir de la détection d'un échantillon positif dans une armoire de culture classique, et lorsque la préculture est acceptable, il est avantageux de précultiver l'échantillon alors qu'il est en transit vers le laboratoire. De nombreux laboratoires de microbiologie fonctionnent 24 heures sur 24, et néanmoins il y a toujours des retards inutiles dans le traitement d'échantillons. Le procédé de cet aspect possède un avantage provenant du long délai du moment où l'échantillon (par exemple, sang) est prélevé (à partir d'un patient) au moment où l'échantillon est placé dans une armoire de culture automatisée dans un système de diagnostic dans un laboratoire de microbiologie. Les inventeurs ont reconnu que, contrairement à l'approche de l'état antérieur de la technique pour ce type d'échantillon, il est avantageux de chauffer l'échantillon jusqu'à au-dessus de la température ambiante après qu'il a été collecté à partir d'un sujet test

et d'incuber ainsi l'échantillon au cours du transport, plutôt que de le refroidir ou de le maintenir à température ambiante.

5 Les conteneurs de transport de l'état antérieur de la technique pour la culture sont connus dans le domaine de la culture cellulaire et du transport de tissu étant donné que le coût et le besoin sont supérieurs dans ce domaine. Un exemple d'un tel conteneur est décrit dans US 8074465. Celui-ci divulgue un système de conteneur de transport isolé thermiquement comprenant : un conteneur pouvant être fermé ayant une partie isolée thermiquement, le conteneur étant configuré pour le stockage ou l'expédition d'un produit à base de myoblastes squelettiques ; une cartouche pouvant être scellée à l'intérieur du conteneur, la cartouche étant configurée pour maintenir le produit à base de myoblastes squelettiques ; et un réfrigérant à l'intérieur du conteneur, le réfrigérant étant configuré pour maintenir une température interne dans la cartouche dans la plage de -5°C à 15°C pendant une période d'au moins 72 heures. Cependant, cet état antérieur de la technique ne présente aucune suggestion d'utiliser un tel conteneur dans le contexte du procédé de l'invention.

25 L'état antérieur de la technique comprend également des conteneurs qui sont conçus pour le transport et le chauffage d'une matière biologique afin de conserver la matière biologique. Par exemple, GB 2055530 divulgue un boîtier chauffé électriquement pour le transport d'une solution de perfusion et US 6028293 divulgue un conteneur à température contrôlée pour le transport de tissu biologique comprenant la peau humaine. Il est cependant important de se rendre compte que l'objectif de tels dispositifs est

considérablement différent de l'objectif du dispositif de US 8074465 et similaires, et est encore très différent de l'objectif du conteneur dans le présent procédé, puisque la conservation de matières biologiques est faite pour des 5 raisons très différentes de l'incubation d'échantillons cliniques pour cultiver l'échantillon. En effet, l'homme du métier ne considérerait pas l'utilisation d'un dispositif de conservation de tissu tel que dans GB 2055530 ou US 6028293 pour l'incubation d'un échantillon tel que proposé dans 10 US 8074465.

Un dispositif d'incubation utilisant un chauffage dans un dispositif portatif est décrit dans US 2013/226032. La divulgation concerne la stimulation de sang total puis le 15 refroidissement du sang dans le même conteneur au cours du transport et du stockage du sang. Le sang est maintenu dans des tubes de collecte sous vide de sang et un traitement manuel de ces tubes est nécessaire pour ajouter manuellement des ingrédients actifs tels que des anticoagulants et des 20 stimulants, et ensuite pour introduire une membrane leucocytaire dans les tubes.

Un appareil portatif tel que décrit ci-après peut être utilisé pour le transport d'un échantillon clinique tout 25 en précultivant l'échantillon clinique. L'appareil portatif décrit ici peut être proposé comme partie d'un système de test plus large pour tester un échantillon clinique. L'appareil portatif est utilisé pour transporter et précultiver l'échantillon clinique avant le test, ce qui 30 fournit des avantages significatifs par rapport au temps pris pour obtenir un résultat de test final. A la suite de la période de préculture (à savoir le transport), le premier récipient de culture, qui est de préférence un flacon de

culture de sang, peut être introduit dans un système de traitement d'échantillon clinique. Un mode de réalisation à titre d'exemple de la présente invention fournit ainsi un système de test d'échantillon clinique comprenant :
5 l'appareil portatif tel que décrit, par exemple, avec référence aux Figures 6 à 9, conjointement avec un système de traitement d'échantillon clinique pour tester encore l'échantillon clinique.

10 De manière avantageuse, l'appareil portatif permet la préculture d'un échantillon clinique entre le moment auquel l'échantillon clinique est introduit dans un récipient de culture, et le moment auquel le récipient de culture est introduit dans un système de traitement d'échantillon 15 clinique. Ceci permet par conséquent un plus grand degré de croissance microbienne que celui qui serait obtenu en l'absence d'incubation, augmentant ainsi le nombre de cellules microbiennes dans un échantillon disponible pour le test. Ceci peut réduire de manière avantageuse la durée 20 d'incubation qui est requise avant que les étapes de test ultérieures puissent être réalisées, et/ou augmenter l'efficacité et/ou la sensibilité de telles étapes. Par la préculture des cellules microbiennes au cours de ce qui serait autrement un temps mort dans un flux de travail pour 25 diagnostiquer une septicémie, la présente invention en effet avance le moment auquel une culture de l'échantillon clinique est amorcée, réduisant ainsi le temps nécessaire après l'obtention d'un échantillon à partir d'un patient pour un diagnostic réussi. Les transport et incubation simultanés 30 d'un échantillon clinique dans un tel appareil portatif peuvent ainsi avantageusement être incorporés dans un procédé de détection et de caractérisation d'un microorganisme dans un échantillon clinique.

A la suite d'une période de préculture (à savoir durant le transport), le premier récipient de culture peut être introduit dans un système de traitement d'échantillon clinique. Tel que mentionné ci-dessus et expliqué plus en détail ci-après, un instrument ou dispositif dédié peut être fourni pour réaliser n'importe laquelle ou la totalité des étapes après l'étape (b)(i) du premier aspect de la présente invention, ou les étapes (b)(ii)-(f) du second aspect de l'invention, qui peut être conçu pour recevoir le premier récipient de culture contenant la culture d'échantillon clinique pour cultiver et faire les tests AST et ID.

Il sera observé que les procédés de la présente invention reposent sur la culture d'un échantillon clinique alors qu'il est transporté à partir d'un sujet test à un emplacement pour le test (par exemple un laboratoire de pathologie). Des aliquotes de la culture d'échantillon clinique peuvent être prélevées pour permettre tout d'abord à des tests moléculaires et en second lieu un AST rapide d'être réalisés avec une période ultérieure d'incubation réduite ou sans période ultérieure d'incubation nécessaire avant que le test puisse avoir lieu. En outre, le procédé permet à des tests moléculaires d'être réalisés tout en conservant l'option d'utiliser le même échantillon clinique pour d'autres tests classiques.

Conformément au second aspect de l'invention, ceci peut être réalisé en le cultivant alors que les tests moléculaires (étape (e)), et facultativement également l'AST de l'étape (f), sont réalisés. Ceci peut être une culture unique (par exemple, continuer à incuber l'échantillon clinique) ou une autre culture peut être programmée, par

exemple laquelle peut être utilisée pour fournir une aliquote pour le test alors que la première culture ou la culture initiale est maintenue en culture (à savoir continue d'être en culture). En effet, en continuant de cultiver l'échantillon ou la partie durant les tests moléculaires de l'étape (e), et facultativement également durant l'étape (f), la culture requise pour les autres tests (par exemple classiques) est en effet réalisée en parallèle avec les tests moléculaires et AST des étapes (e) et (f). En conséquence, l'étape (f) du procédé peut, dans certains modes de réalisation, être exprimée comme réalisant un test de susceptibilité antimicrobienne sur un autre aliquote de l'échantillon clinique cultivé ou partie provenant de l'étape (c).

15

Ainsi, dans un mode de réalisation, cet aspect de l'invention fournit un procédé comprenant :

a) introduire un échantillon clinique dans un récipient de culture contenant un milieu de culture ;

20 b (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du récipient de culture dans un compartiment isolé thermiquement d'un conteneur pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon, le compartiment isolé thermiquement et le chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver 25 l'échantillon clinique ;

30 b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit récipient de culture ;

c) retirer une aliquote de test à partir dudit récipient de culture, et continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit récipient de culture ;

5 d) séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test ;

e) réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme,

10 lesdits tests d'acide nucléique étant réalisés à l'aide de :

i) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable

15 d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable

20 d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes et/ou amorces se sont

25 hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont été étendues (par exemple une réaction d'amplification a eu lieu) ; et

f) si un microorganisme est identifié dans l'étape

(e), réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur

30 ledit échantillon clinique cultivé provenant de l'étape (c), la croissance microbienne dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant surveillée par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et

la concentration d'agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés dans l'étape (e), et facultativement 5 continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit récipient de culture.

Dans le mode de réalisation ci-dessus, le récipient de culture représente le premier récipient de culture selon 10 les procédés de l'invention.

Comme noté ci-dessus, dans un autre aspect, une autre culture peut être établie à partir de l'échantillon clinique. Dans un tel mode de réalisation, un échantillon 15 clinique peut être introduit dans un premier récipient de culture, et après la période de préculture de l'échantillon clinique (à savoir durant le transport), une partie du contenu du premier récipient de culture peut être retirée et utilisée pour inoculer un second récipient de culture. Comme 20 mentionné ci-dessus et expliqué davantage ci-après, un instrument ou dispositif dédié peut être fourni pour réaliser le procédé de l'invention, et ceci peut être utilisé conjointement à un système ou instrument de culture classique pour réaliser des tests classiques si souhaité ou nécessaire 25 (par exemple, une armoire de culture provenant de Becton Dickinson ou Biomerieux). Un tel instrument/dispositif dédié peut être conçu pour recevoir le premier récipient de culture contenant l'échantillon clinique, et pour retirer une partie à partir du premier récipient de culture et l'introduire dans 30 le second récipient de culture. Ceci peut permettre au premier récipient de culture d'être placé dans un autre système de culture (par exemple un incubateur) pour tester par l'intermédiaire de moyens classiques, alors que la partie

de la culture d'échantillon clinique obtenue à partir de celui-ci est retenue dans le dispositif de la présente invention pour la culture (comprenant la préculture facultative) et le test AST et ID.

5

Le procédé de cet aspect de la présente invention peut par conséquent comprendre :

a) introduire un échantillon clinique dans un premier récipient de culture contenant un milieu de culture ;

b (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du premier récipient de culture dans un compartiment isolé thermiquement d'un conteneur pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon, le compartiment isolé thermiquement et le chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver l'échantillon clinique ;

b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit premier récipient de culture ;

b (iii)) retirer une partie de la culture d'échantillon clinique à partir dudit premier récipient de culture, et introduire ladite partie dans un second récipient de culture contenant un milieu de culture et facultativement précultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

c) retirer une aliquote de test à partir dudit second récipient de culture, et continuer à cultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

d) séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test ;

e) réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, lesdits tests d'acide nucléique étant réalisés à l'aide de :

10 i) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

15 ii) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance 20 antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes et/ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces se sont étendues (par exemple une réaction d'amplification a eu lieu) ; et

25 f) si un microorganisme est identifié dans l'étape (e), réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ladite partie cultivée provenant de l'étape (c), la croissance microbienne dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant surveillée par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et 30 la concentration d'agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance

antimicrobienne détectés dans l'étape (e), et facultativement continuer à cultiver ladite partie dans ladite seconde culture.

5 En effet, dans n'importe lequel des modes de réalisation de cet aspect de la présente invention, d'autres tests ID et/ou AST, qu'ils soient classiques ou non, peuvent être réalisés sur l'échantillon cultivé ou la partie cultivée indépendamment du fait qu'un résultat d'identification positif dans l'étape (e) soit obtenu ou non. Le procédé permet ainsi une culture de l'échantillon clinique ou de la partie d'avoir lieu pour permettre à une identification supplémentaire et/ou à des tests AST d'être réalisés, par exemple simplement pour fournir un résultat supplémentaire, 10 15 par exemple comme sauvegarde ou confirmation. Dans un autre mode de réalisation, d'autres tests (par exemple des tests classiques) peuvent être effectués qu'il y ait ou non un résultat positif provenant des tests ID de l'étape (e) et/ou du test AST de l'étape (f). Dans un aspect préféré, la 20 25 culture de l'échantillon clinique (à savoir du premier récipient de culture) est continuée pour permettre à d'autres tests d'identification microbienne et de susceptibilité antimicrobienne d'être réalisés.

Il sera en outre entendu que les tests des étapes (e) et/ou (f) peuvent être répétés, ou réalisés une ou plusieurs fois, c'est-à-dire que des aliquotes peuvent être retirées à partir de la première ou seconde culture une ou plusieurs fois, par exemple à des intervalles, pour réaliser 30 des tests d'acide nucléique de l'étape (f) une ou plusieurs fois (par exemple au moins deux fois, par exemple 2 ou 3 fois). Facultativement, le test AST de l'étape (f) peut également être réalisé plus d'une fois, si tel est le

souhait. Comme noté ci-dessus, la culture de l'échantillon clinique dans le premier récipient de culture peut être continuée, alors que le test AST de l'étape (f) est en cours, et facultativement également après que le test a été réalisé.

5 Ainsi, la possibilité existe de répéter le test AST ou de continuer la culture davantage pour permettre un test classique. Comme le contexte le montre clairement, une aliquote de l'échantillon clinique cultivé ou partie retirée à partir de celui-ci dans le premier ou second récipient de

10 culture est simplement une partie, à savoir une part ou fraction du contenu de récipient de culture. L'aliquote peut être retirée et utilisée directement pour les tests d'acide nucléique de l'étape (e), (c'est-à-dire après la séparation de l'ADN à partir de l'aliquote de test dans l'étape (d)), ou

15 dans un test AST de l'étape (f), ou elle peut être soumise à une période de culture avant la réalisation des tests des étapes (d)/(e) et/ou de l'étape (f). En outre, une aliquote de test retirée à partir du premier ou second récipient de culture peut être divisée en sous-aliquotes ou fractions

20 d'aliquote, ou une sous-aliquote ou fraction peut être retirée à partir de celle-ci, lesquelles peuvent être soumises au test ou à une culture supplémentaire. Cette culture d'une aliquote de test ou fraction d'aliquote retirée peut être réalisée séparément, ou indépendamment, de la

25 culture ou de la culture continuée de l'échantillon clinique dans le récipient de culture.

De manière analogue aux modes de réalisation du second aspect de la présente invention décrit ci-dessus, conformément au premier aspect de la présente invention, le premier récipient de culture peut être introduit dans un système de traitement d'échantillon clinique, et n'importe laquelle ou la totalité des étapes après l'étape (b)(i) de

transport et d'incubation simultanés initiale peuvent être réalisées dans ou à l'aide d'un tel système. Un instrument ou dispositif dédié peut être fourni pour réaliser n'importe laquelle ou la totalité de ces étapes, lequel dispositif peut 5 être conçu pour recevoir le premier récipient de culture contenant la culture d'échantillon clinique pour le test.

De manière similaire, des aliquotes de la culture d'échantillon clinique peuvent être prélevées pour permettre 10 à des tests d'identification et/ou caractérisation microbienne d'être réalisés avec une période ultérieure réduite ou sans période ultérieure d'incubation nécessaire avant que le test puisse avoir lieu. En outre, le procédé permet à des tests moléculaires d'être réalisés tout en 15 conservant l'option d'utiliser le même échantillon clinique pour d'autres tests classiques.

Ceci peut, par exemple, être réalisé par la culture de l'échantillon clinique alors que de tels tests sont 20 effectués. Ceci peut être une culture unique (par exemple, continuer à incuber l'échantillon clinique) ou une autre culture peut être établie, par exemple laquelle peut être utilisée pour fournir une aliquote pour le test alors que la première culture ou culture initiale est maintenue en culture 25 (à savoir, continue d'être en culture). En effet, en continuant à cultiver l'échantillon ou partie alors que le test est effectué, la culture requise pour les autres tests (par exemple, classiques) est en effet en cours en parallèle avec les tests d'identification et/ou de caractérisation 30 conformément à cet aspect de l'invention.

Ainsi, dans un mode de réalisation, cet aspect de l'invention concerne un procédé comprenant :

a) introduire un échantillon clinique dans un récipient de culture contenant un milieu de culture ;

5 b (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du récipient de culture dans un compartiment isolé thermiquement d'un conteneur pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon, le compartiment isolé thermiquement et le chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver l'échantillon clinique ;

10 b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit récipient de culture ;

c) retirer une aliquote de test à partir dudit récipient de culture, et continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit récipient de culture ;

20 et séparer l'ADN à partir de l'aliquote de test et réaliser des tests d'acide nucléique sur l'ADN pour identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans le microorganisme, et/ou déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique.

Dans le mode de réalisation ci-dessus, le récipient de culture représente le premier récipient de culture conformément aux procédés de l'invention.

30

Dans un autre mode de réalisation, une culture supplémentaire peut être établie à partir de l'échantillon

clinique tel que décrit ci-dessus conformément au second aspect de l'invention.

Le procédé de cet aspect de la présente invention 5 peut par conséquent comprendre :

a) introduire un échantillon clinique dans un premier récipient de culture contenant un milieu de culture ;

b (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation 10 comprenant le placement du premier récipient de culture dans un compartiment isolé thermiquement d'un conteneur pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon, le compartiment isolé thermiquement et le chauffage étant 15 utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver l'échantillon clinique ;

b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit 20 échantillon clinique dans ledit premier récipient de culture ;

b (iii)) retirer une partie de la culture d'échantillon clinique à partir dudit premier récipient de culture, et introduire ladite partie dans un second récipient 25 de culture contenant un milieu de culture et facultativement précultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

c) retirer une aliquote de test à partir dudit 30 second récipient de culture, et continuer à cultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

et séparer l'ADN à partir de l'aliquote de test et réaliser des tests d'acide nucléique sur l'ADN pour identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence

ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans le microorganisme, et/ou déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique.

5

Dans les procédés de la présente invention, la préculture de l'échantillon clinique (à savoir, la pré-incubation durant le transport) a lieu à l'intérieur d'un appareil portatif comprenant un conteneur pouvant être scellé 10 ayant un compartiment isolé thermiquement pour recevoir le premier récipient de culture ; et un dispositif de chauffage pour chauffer l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon.

15

L'échantillon clinique peut, de préférence, être maintenu à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon. Des températures appropriées pour la préculture de l'échantillon peuvent varier selon le microorganisme présent dans l'échantillon ; cependant, des températures préférées envisagées sont de 20 à 40°C, ou 25 à 20 40°C, par exemple 25 à 37°C, ou 30 à 35°C. Ici, le maintien de la température signifie maintenir la température de l'échantillon à l'intérieur d'une plage donnée (à laquelle la préculture peut toujours avoir lieu) pendant un laps de temps 25 prédéterminé, ou jusqu'à ce que le récipient de culture soit retiré du conteneur. De préférence, l'échantillon est maintenu à une température qui est dans les 5 degrés de la température optimale, de façon davantage préférée dans les 2 degrés de la température optimale.

30

Dans certains modes de réalisation, le premier récipient de culture peut être agité durant le transport, pour ainsi agiter l'échantillon. Ainsi, dans certains modes

de réalisation, l'échantillon clinique peut être agité durant le transport. Le récipient de culture peut être agité périodiquement ou de manière continue. Ainsi, l'appareil portatif peut, dans certains modes de réalisation, comprendre 5 un agitateur (un mécanisme agiteur) pour agiter l'échantillon à l'intérieur du récipient de culture durant le transport. Ceci peut être un mécanisme pour agiter le récipient de culture lui-même et ainsi agiter l'échantillon, par exemple, en déplaçant le récipient de culture par rapport 10 à l'appareil portatif. En variante, le récipient peut rester fixe par rapport à l'appareil portatif, l'échantillon étant déplacé à l'intérieur du récipient, comme par un barreau agitateur magnétique ou un chauffage différentiel tel que discuté ci-après.

15

Selon la nature du récipient, du milieu, du microorganisme suspecté, de l'état clinique, etc., le récipient et/ou l'échantillon à l'intérieur du récipient peuvent être agités ou mis en rotation, secoués, etc. Une agitation au cours du chauffage assure un chauffage homogène de l'échantillon ainsi que favorise une culture efficace de l'échantillon (par exemple, en permettant une distribution homogène des nutriments dans l'échantillon et/ou en permettant une aération de l'échantillon, et/ou pour 20 décourager la formation de biofilm et/ou l'agglutination microbienne durant la préculture). Dans certains cas, l'utilisation d'agitation a ainsi été trouvée comme étant bénéfique au fonctionnement de l'appareil de préculture. Des modes représentatifs d'agitation sont discutés en référence à 25 30 l'agencement de l'appareil portatif ci-après.

La préculture de l'échantillon clinique est réalisée durant la période de temps entre l'obtention d'un

échantillon clinique à partir d'un sujet test et l'introduction (par exemple, l'insertion) du premier récipient de culture contenant l'échantillon clinique dans le système de traitement d'échantillon clinique. Typiquement,
5 ceci pourrait être au moins 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 heures. La préculture peut avoir lieu pendant toute période de temps appropriée ou souhaitée, mais afin d'accélérer le procédé, elle sera de préférence pendant une courte période de temps inférieure à 8 ou inférieure à 6 heures. Par exemple, la
10 préculture peut avoir lieu pendant jusqu'à 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 heures avant le début du test, ou plus particulièrement avant le retrait de l'aliquote de test dans l'étape (c). En variante, la préculture peut avoir lieu pendant moins d'1 heure. La préculture peut également avoir lieu pendant plus
15 de 6 heures, par exemple pendant 7, 8 ou 9 heures, ou plus de 9 heures, par exemple jusqu'à 10 ou 12 heures, ou même plus longtemps, mais dans les intérêts de fournir un procédé rapide, elle est généralement conservée à un minimum, et de courtes périodes de préculture jusqu'à 6, ou plus
20 particulièrement jusqu'à 4 ou 3 heures, sont préférées. Comme noté ci-dessus, la préculture peut avoir lieu pendant une période plus courte qu'il n'est nécessaire pour voir un résultat de culture positif ou elle peut avoir lieu jusqu'à ce qu'un résultat de culture positif soit obtenu.

25

L'étape de culture de l'échantillon clinique dans le premier récipient de culture ou dans la partie retirée du premier récipient de culture, ou également de culture d'une aliquote de test/fraction d'aliquote, peut être réalisée de
30 n'importe quelle façon pratique ou souhaitée, telle que décrite plus en détail ci-après. A cet égard, des appareils de culture pour la culture d'échantillons cliniques par exemple à des fins de diagnostic ou de détection microbienne

sont connus et peuvent être utilisés. Différents appareils de culture ou systèmes de culture peuvent être utilisés pour la culture séparée de l'échantillon de culture (par exemple, les premier et second récipients de culture), et/ou de n'importe 5 quelles aliquotes de tests/fractions d'aliquotes retirées et/ou pour la culture requise durant le test AST. En outre, tel que mentionné ci-dessus et décrit plus en détail ci-après, il est envisagé selon la présente invention de fournir également un appareil, ou un dispositif, pour réaliser le 10 procédé de détection microbienne et de caractérisation microbienne tel que décrit ici. Un tel dispositif, ou système, peut comprendre un appareil ou des moyens pour cultiver le récipient de culture. Selon les diverses étapes 15 de culture du procédé, comprenant la culture/culture continuée du premier et/ou second récipient de culture, la culture d'une aliquote de test ou fraction d'aliquote, ou en effet également la culture durant un test AST (par exemple, le test AST de l'étape (f) selon le second aspect de la présente invention) peuvent être réalisées dans le même 20 système de culture ou appareil de culture ou dans des systèmes de culture ou appareils de culture différents. Ainsi, dans un mode de réalisation, à la suite de l'étape de préculture (b)(i), le premier récipient de culture peut être introduit dans un appareil de culture ou système de culture 25 pour la culture continuée de l'échantillon clinique. De préférence, l'appareil de culture ou système de culture peut être un dispositif de détection de microorganisme tel que décrit en plus grand détail ci-après. Le premier et/ou second récipient de culture peut facultativement ou 30 additionnellement être transféré dans un système/appareil de culture différent, par exemple s'il y a un résultat négatif à partir du test d'identification de l'étape (e).

La surface d'un récipient de culture (par exemple, le premier et/ou second récipient de culture) peut être nettoyée ou décontaminée avant d'être placée dans un appareil de culture (par exemple, après que l'échantillon clinique ou 5 la partie a été introduit dans le récipient de culture).

Ainsi, par exemple, dans un mode de réalisation, le récipient de culture (par exemple, le premier récipient de culture) peut être cultivé dans un système alors que les 10 étapes de test sont effectuées. Si un test d'identification (par exemple, les tests d'identification de l'étape (e) conformément au second aspect de la présente invention) est négatif et/ou non concluant, ou si un test AST (par exemple, le test AST de l'étape (f) selon le second aspect de 15 l'invention) est négatif, non concluant ou incomplet, le récipient de culture peut ensuite être transféré à un autre système de culture ou système de culture séparé, par exemple pour permettre à des tests d'identification classiques et/ou à des tests AST d'être effectués. Par exemple, un tel système 20 de culture supplémentaire ou séparé peut être une armoire de culture classique, ou un système de test microbien/détection microbienne automatisé (par exemple, un système de diagnostic).

25 Dans certains modes de réalisation, les procédés de la présente invention peuvent ainsi comprendre une étape de culture supplémentaire de l'échantillon clinique et/ou de la partie si aucune souche de microorganisme n'est identifiée dans l'étape (e) pour permettre à des tests supplémentaires 30 d'identification microbienne et de susceptibilité antimicrobienne d'être réalisés pour identifier le microorganisme et déterminer son profil de résistance antimicrobienne.

Au moyen d'un exemple représentatif, dans un mode de réalisation conformément au second aspect de l'invention, l'échantillon clinique, collecté à partir d'un sujet test,
5 est introduit dans un récipient de culture, et pré-cultivé dans un appareil portatif comprenant un conteneur pouvant être scellé ayant un compartiment isolé thermiquement pour recevoir le récipient de culture avant qu'une aliquote de test soit retirée (étape (c)) et soit soumise aux étapes (d) et (e). Alors que les étapes (d) et (e) sont effectuées, le récipient de culture est mis en culture. Facultativement, le récipient de culture peut être introduit dans un appareil de culture ou système de culture avant l'étape (c). Si l'étape
10 de test d'identification (e) génère un résultat positif, une aliquote supplémentaire peut être retirée du récipient de culture et soumise à l'AST de l'étape (f). Si le test d'identification dans l'étape (e) est négatif, le récipient de culture contenant l'échantillon clinique peut être soumis à une autre culture, par exemple, dans un système séparé.
15

20

Dans un mode de réalisation supplémentaire, une aliquote de test est retirée du récipient de culture (étape (c) telle que ci-dessus) et à partir de cette aliquote, une fraction est soumise aux étapes (d) et (e) (séparation
25 d'acide nucléique et détection). Au cours de cette période, une fraction d'aliquote supplémentaire ou le reste de l'aliquote de test est soumis à une culture, comme l'est le récipient de culture à partir duquel l'aliquote de test est retirée. Cette culture de l'aliquote séparée/fraction
30 d'aliquote séparée et récipient de culture peut avoir lieu dans les mêmes systèmes ou dans des systèmes différents. Si le test d'identification de l'étape (e) génère un résultat positif, la fraction d'aliquote supplémentaire

5 cultivée/l'aliquote restante est soumise à l'AST de l'étape (f). Si le test d'identification dans l'étape (e) est négatif, le récipient de culture contenant l'échantillon clinique est soumis à une autre culture, par exemple dans un système séparé.

10 Dans encore un autre mode de réalisation, une partie est retirée à partir du premier récipient de culture après la période de préculture et introduite dans un second récipient de culture contenant un milieu de culture. Une aliquote de test est retirée à partir du second récipient de culture (étape (c), et soumise aux étapes (d) et (e)). Au cours de cette période, le second récipient de culture est cultivé. Si le test d'identification de l'étape (e) génère un résultat positif, une autre aliquote est retirée à partir du second récipient de culture et soumise à l'AST de l'étape (f). Si le test d'identification dans l'étape (e) est négatif, le second récipient de culture contenant l'aliquote d'échantillon est soumis à une autre culture. Dans un mode de 15 réalisation supplémentaire, le premier récipient de culture peut additionnellement ou à la place être soumis à une culture supplémentaire, par exemple dans un système séparé.

20

25 N'importe lequel des modes de réalisation ci-dessus peut comprendre une culture continuée du premier récipient de culture contenant l'échantillon clinique indépendamment de savoir si un résultat d'identification positif ou négatif dans l'étape (e) a été obtenu. De cette façon, un résultat supplémentaire peut être obtenu à partir de l'échantillon.

30

De manière analogue, dans des modes de réalisation selon le premier aspect de la présente invention, l'échantillon clinique, collecté à partir d'un sujet test,

est introduit dans un récipient de culture, et pré-cultivé dans un appareil portatif comprenant un conteneur pouvant être scellé ayant un compartiment isolé thermiquement pour recevoir le récipient de culture avant qu'une aliquote de test soit retirée (étape (c)) et soit soumise à des tests d'acide nucléique pour identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans le microorganisme, et/ou déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique. Alors que ces étapes sont effectuées, le récipient de culture est mis en culture. Facultativement, le récipient de culture peut être introduit dans un appareil de culture ou système de culture avant l'étape (c). Une aliquote supplémentaire ou des aliquotes supplémentaires peuvent être retirées à partir du récipient de culture et soumise(s) à un ou des tests supplémentaires, par exemple un test dans le but de déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique si un test dans le but d'identifier ledit microorganisme avait été auparavant effectué, ou en variante, si le résultat d'un premier test est négatif (par exemple, un test ID microbien), le test pouvant être répété après une telle période de culture supplémentaire. Le récipient de culture contenant l'échantillon clinique peut en variante ou additionnellement être soumis à une autre culture, par exemple, dans un système séparé.

Dans un autre mode de réalisation, une aliquote de test est retirée du récipient de culture (étape (c) telle que ci-dessus), et à partir de cette aliquote, une fraction est soumise à des tests d'acide nucléique pour identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence ou l'absence

d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans le microorganisme, et/ou déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique. Durant cette période, une fraction 5 d'Aliquote supplémentaire ou le reste de l'Aliquote de test est soumis à la culture, comme l'est le récipient de culture à partir duquel l'Aliquote de test est retirée. Cette culture de l'Aliquote séparée/fraction d'Aliquote séparée et du récipient de culture peut avoir lieu dans les mêmes systèmes 10 ou des systèmes différents. Un test supplémentaire sur la fraction d'Aliquote supplémentaire cultivée/aliquote restante peut ensuite être effectué comme décrit ci-dessus, et le récipient de culture contenant l'échantillon clinique peut facultativement être soumis à une autre culture, par exemple 15 dans un système séparé.

Dans encore un autre mode de réalisation, une partie est retirée à partir du premier récipient de culture après la période de préculture et introduite dans un second 20 récipient de culture contenant un milieu de culture. Une Aliquote de test est retirée à partir du second récipient de culture (étape (c)), et soumise à des tests d'acide nucléique pour identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques 25 de résistance antimicrobienne dans le microorganisme, et/ou déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique. Durant cette période, le second récipient de culture est mis en culture. Une autre Aliquote peut être retirée à partir du second 30 récipient de culture et soumise à un test supplémentaire tel que décrit ci-dessus. Le second récipient de culture contenant l'Aliquote d'échantillon et/ou le premier récipient

de culture peut être soumis à une culture supplémentaire, par exemple dans un système séparé.

Il sera observé par conséquent que, dans certains modes de réalisation préférés, le test (par exemple, le test moléculaire) a lieu (à savoir, les tests d'acide nucléique de l'étape (e) conformément au second aspect de l'invention, ou les tests d'acide nucléique pour identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans le microorganisme dans l'échantillon clinique conformément au premier aspect de l'invention) sans n'importe quelle autre culture de l'échantillon clinique (à savoir sans n'importe quelle culture au-delà de la préculture qui a lieu à l'intérieur de l'appareil de transport). Dans d'autres modes de réalisation, le test (par exemple, le test moléculaire) peut avoir lieu avec une période réduite de culture supplémentaire. Dans de nombreuses procédures de test microbien telles que réalisées aujourd'hui, des tests d'identification (que ce soit par des tests biochimiques classiques ou par des tests moléculaires) ont lieu une fois qu'il y a eu un résultat positif dans une culture microbienne, à savoir une fois que la croissance microbienne a été détectée (un test de culture positif). Ainsi par exemple, un échantillon de sang ou autre échantillon est introduit dans un récipient de culture (par exemple, un flacon de culture de sang), et ceci est mis en culture. Le système de culture peut être conçu ou sélectionné pour indiquer que (quand) la croissance microbienne a eu lieu, par exemple en comprenant une substance indicatrice qui génère un signal dépendant de la croissance microbienne (par exemple, en raison du changement de pH, ou de la conversion/consommation d'un substrat, ou de la génération

d'un produit métabolique microbien, etc.) ou simplement par détection de la croissance microbienne par n'importe quels moyens. Quand/si une croissance microbienne suffisante a lieu pour générer un signal/donner une croissance détectable, ceci
5 indique un résultat « positif » dans la culture/détection microbienne (à savoir qu'il y a une croissance d'un microorganisme dans l'échantillon clinique, bien que l'on ne connaisse pas à ce stade quelle est l'identité du microorganisme). A ce stade, les tests d'identification et/ou
10 AST sont habituellement réalisés. Le test de croissance microbienne peut prendre quelques heures, par exemple 6, 8, 10 ou 12 heures ou plus, pour être effectué.

La présente invention a l'avantage qu'un degré de croissance microbienne peut avoir lieu avant le moment où une culture microbienne serait initialisée dans une procédure de test microbien classique telle que présentement réalisée. Ceci peut réduire la durée entre l'obtention d'un échantillon clinique à partir d'un sujet et l'obtention d'un test de culture positif, et peut également réduire la durée entre l'obtention d'un échantillon clinique à partir d'un sujet et le début de la réalisation d'un test moléculaire pour identifier la nature du microorganisme dans l'échantillon clinique. En outre, il n'est pas nécessaire d'attendre qu'un résultat positif dans un test de culture ait été obtenu comme un degré de croissance microbienne peut avoir lieu dans l'étape (b), signifiant qu'une identification microbienne peut être plus rapidement obtenue. L'étape (b) permet ainsi à une étape de préculture d'avoir lieu durant le transport, par exemple avant qu'un premier récipient de culture soit introduit dans un appareil de culture et par conséquent avant qu'un résultat positif puisse être obtenu dans un test de culture classique. Ainsi, dans un mode de réalisation

représentatif conformément au second aspect de l'invention, les étapes (d) et (e) ont lieu avant qu'il n'y ait un résultat de test de culture positif. Dans un mode de réalisation supplémentaire de cet aspect, les étapes (d) et 5 (e) sont d'abord effectuées avant qu'un résultat de culture positif soit obtenu (ou avant la durée qui serait requise pour obtenir un résultat de culture positif) et peuvent être répétées après un résultat de culture positif (ou la période de temps requise pour un résultat positif). En d'autres 10 termes, dans un mode de réalisation préféré de cet aspect de l'invention, au moins un ensemble de tests d'acide nucléique (étape (e)) est réalisé avant qu'il n'y ait un résultat de culture positif, ou plus particulièrement avant la durée qui serait requise pour qu'un résultat de culture positif soit 15 obtenu. Dans un mode de réalisation représentatif supplémentaire de cet aspect, l'étape (f) (une étape d'AST) peut également être effectuée avant qu'un résultat positif soit obtenu ou puisse être obtenu dans un test de culture. Cependant, il n'est pas interdit selon le procédé de cet 20 aspect de la présente invention de réaliser les étapes de test (e) et (f) après un résultat de culture positif, par exemple de retirer l'aliquote de test dans l'étape (c) après un résultat de test positif. Dans un tel cas, il peut être observé qu'une étape de préculture (b) puisse mettre en jeu 25 la culture du premier récipient de culture jusqu'à ce qu'un résultat de test de culture positif soit obtenu ou jusqu'à un moment auquel un résultat de test de culture positif serait attendu.

30 De manière similaire, selon le premier aspect de l'invention, des tests d'acide nucléique pour identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance

antimicrobienne dans le microorganisme, et/ou déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique ont lieu avant un résultat de test de culture positif. Dans un autre mode de réalisation de cet aspect de l'invention, de tels tests sont d'abord effectués avant qu'un résultat de culture positif soit obtenu (ou avant la durée qui serait requise pour obtenir un résultat de culture positif) et peuvent être répétés après un résultat de culture positif (ou après la période de temps requise pour un résultat positif). Par exemple, au moins un ensemble de tests d'acide nucléique peut être réalisé avant qu'il n'y ait un résultat de culture positif, ou plus particulièrement avant la durée qui serait requise pour qu'un résultat de culture positif soit obtenu, et/ou un essai AST peut également être effectué avant qu'un résultat positif soit obtenu ou puisse être obtenu dans un test de culture. Cependant, il est également envisagé que des tests d'acide nucléique pour identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans le microorganisme, et/ou déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique puissent avoir lieu après un résultat positif, à savoir une aliquote de test est retirée dans l'étape (c) après un résultat de test positif. Dans un tel cas, il peut être observé qu'une étape de préculture (b) peut mettre en jeu la culture du premier récipient de culture jusqu'à ce qu'un résultat de test de culture positif soit obtenu ou jusqu'à un moment auquel un résultat de test de culture positif serait attendu.

30

En relation avec les tests d'acide nucléique décrits ici (par exemple, les tests de l'étape (e) selon le second aspect de l'invention), dans un mode de réalisation

préféré, un premier ensemble de sondes d'acide nucléique sont utilisées, lesquelles s'hybrident spécifiquement à une séquence nucléique qui est identificatrice d'un microorganisme et un second ensemble de sondes qui 5 s'hybrident spécifiquement à une séquence nucléotidique qui représente un marqueur génétique de résistance antimicrobienne. Dans un tel mode de réalisation, la détection de l'hybridation de sonde peut mettre en jeu, ou peut avoir lieu par, une amplification de sonde. Ainsi, la 10 détection de l'hybridation de sonde peut être effectuée par détection d'amplification de sonde. En conséquence, les procédés de l'invention peuvent comprendre (par exemple, dans l'étape (e) selon le second aspect de l'invention) l'utilisation d'une ou plusieurs amorces d'amplification pour 15 la sonde, c'est-à-dire une ou des amorces conçues ou sélectionnées pour l'amplification d'une sonde qui s'est hybridée à sa séquence nucléotidique cible. Tel qu'il est décrit plus en détail ci-après, dans certains modes de 20 réalisation préférés, la sonde peut être conçue pour être ligaturée si elle s'est hybridée à sa séquence nucléotidique cible, par exemple une réaction de ligature conçue pour circulariser la sonde. La ligature de sonde est ainsi indicatrice de la présence de la séquence cible. Une sonde ligaturée (par exemple, circularisée) peut être détectée par 25 amplification de la sonde ligaturée, par exemple par génération d'un produit d'amplification à l'aide de la sonde ligaturée comme matrice (par exemple, une sonde circularisée peut être une matrice pour une réaction RCA) et le produit d'amplification peut être détecté, soit directement, soit par 30 utilisation d'une sonde de détection qui s'hybride au produit d'amplification.

Le test AST (par exemple, le test de l'étape (f) selon le second aspect de l'invention) peut, tel que décrit davantage ci-après, être effectué de n'importe quelle façon pratique ou souhaitée. En conséquence, la croissance 5 microbienne peut être évaluée (ou déterminée) en présence de différents agents antimicrobiens (par exemple, antibiotiques) et/ou différentes quantités ou concentrations d'agent antimicrobien (par exemple, antibiotique). La croissance peut être évaluée directement ou par évaluation (détermination) de 10 marqueurs de croissance.

En conséquence, la croissance microbienne peut être évaluée par détermination de la quantité de matière cellulaire microbienne (c'est-à-dire la biomasse microbienne) 15 présente dans un échantillon, en particulier par évaluation ou détermination de ceci directement. Dans un mode de réalisation préféré, ceci est obtenu par détermination de la quantité de biomasse microbienne visuellement, et en particulier par imagerie. En particulier, des images 2-D 20 peuvent être obtenues et évaluées. Ainsi, dans un mode de réalisation préféré, l'aire de biomasse microbienne peut être déterminée (plus particulièrement, l'aire de biomasse microbienne dans le champ de vision soumis à l'étude, par exemple dans une image).

25

La croissance microbienne peut être évaluée par détermination de la quantité de matière cellulaire microbienne (c'est-à-dire la biomasse microbienne) présente dans un échantillon (ici, spécifiquement, dans les cultures 30 microbiennes de test préparées pour le test AST) en particulier par évaluation ou détermination de ceci directement. Dans un mode de réalisation préféré, ceci est obtenu par détermination de la quantité de biomasse

microbienne visuellement, et en particulier par imagerie. En particulier, les images 2-D alignées perpendiculairement à l'axe optique (dénommées ici alignées selon xy) peuvent être obtenues et évaluées. Une aire spécifique de l'échantillon 5 est couverte dans une image alignée selon xy unique dont la dimension est dépendante des propriétés optiques de l'appareil d'imagerie. Pour chaque position dans l'espace xy, une ou plusieurs images 2D peuvent être collectées à différents intervalles le long de l'axe optique ou z. Ainsi, 10 une série, ou un empilement d'images 2D, peut être généré, fournissant des informations 3D d'un volume d'échantillon. Un autre procédé d'extraction d'informations 3D à partir d'un échantillon est celui employé par Unisensor (voir par exemple, US 8780181), où l'axe optique est incliné par rapport au plan xy, et l'échantillon ou le détecteur est déplacé le long du plan soit x soit y. Ici, une série 15 d'images ayant une extension dans l'espace z, en addition à l'espace xy, est acquise. Par l'intermédiaire d'une transformation ultérieure des données d'image, des empilements d'images 2D alignées perpendiculairement au plan 20 xy peuvent être obtenus également par ce procédé.

Une fois extraites, les informations 3D inhérentes aux empilements d'images 2D peuvent être utilisées pour 25 estimer/induire/déduire la masse cellulaire totale présente dans le volume analysé. Dans un mode de réalisation préféré, les images 2-D peuvent être générées à partir des informations 3-D par exemple, par des projections d'empilements en z dans une image 2-D. Une analyse peut 30 ensuite être effectuée à l'aide de l'image 2-D résultante. L'aire de biomasse microbienne peut être ensuite déterminée comme l'aire de densité optique indiquant une biomasse microbienne dans le champ de vision soumis à l'étude, par

exemple, dans l'image 2D projetée. Un tel procédé est de pratique courante dans la technique et peut augmenter la sensibilité, et des algorithmes pour ceci pour des images en fond clair peuvent être trouvés dans le logiciel disponible 5 au public Cellprofiler provenant de MIT, USA. Une analyse similaire peut être réalisée pour des images fluorescentes, et de nombreux autres algorithmes pour ceci existent, par exemple, dans Cellprofiler, et également dans la plupart des systèmes d'analyse d'images du commerce.

10

Dans un autre mode de réalisation, la variation d'intensité dans l'espace z s'étirant sur chaque position dans l'espace xy est enregistrée, indiquant la masse microbienne dans une position spécifique. Intégré sur la 15 totalité de l'espace xy, ceci donne une mesure du volume microbien total. Des algorithmes pour cette procédure existent également dans des logiciels d'analyse d'images couramment disponibles, par exemple dans le logiciel libre Cellprofiler.

20

Plus généralement, la croissance microbienne peut être évaluée par détermination de la quantité et/ou du nombre et/ou de la taille de microorganismes et/ou de colonies microbiennes ou agrégats microbiens. Comme cela sera discuté 25 plus en détail ci-après, dans certains modes de réalisation préférés, la croissance microbienne est évaluée (déterminée) par imagerie, ou alternativement exprimée, par visualisation des microorganismes. Ainsi, les cellules microbiennes, qui peuvent comprendre des agrégats ou des amas (clusters) de 30 cellules, ou des colonies microbiennes, peuvent être visualisées ou imagées comme moyens de détermination (ou évaluation ou surveillance) de la croissance. Ceci peut comprendre le comptage de cellules ou de colonies, mais n'est

pas limité à de tels procédés et comprend n'importe quels moyens d'évaluation visuelle de la quantité de croissance microbienne par évaluation (ou détermination) de la taille, de l'aire, de la forme, de la morphologie et/ou du nombre de 5 cellules microbiennes, colonies microbiennes ou agrégats microbiens (le terme « agrégat » comprend n'importe quelle collection de cellules à proximité physique par exemple, un amas ou un cluster ; ceci peut comprendre des amas/clusters non clonaux de cellules qui se sont agrégés ou se sont collés 10 les uns aux autres (par exemple, des cellules avoisinantes qui se sont agrégées) ainsi que des colonies clonales). Le paramètre utilisé pour mesurer la croissance microbienne peut, mais n'a pas besoin de, varier selon l'identité du microbe (par exemple, tel que déterminé dans l'étape (e) 15 conformément au second aspect de l'invention) et les agents antimicrobiens utilisés dans l'essai AST (par exemple, étape (f) conformément au second aspect de l'invention). En effet, selon l'organisme et les agents antimicrobiens utilisés, la morphologie ou le motif de croissance des cellules peut être 20 affecté, et ceci peut être modifié ou changé à partir de la morphologie ou du motif de croissance « normal » ou « typique », par exemple en l'absence de l'agent antimicrobien. Alors que certains procédés de surveillance de 25 croissance AST peuvent dépendre de la détection de tels changements, il n'est pas essentiel selon la présente invention de prendre en compte de tels changements et la quantité (par exemple, l'aire) de croissance microbienne ou biomasse peut être déterminée indépendamment de la morphologie et/ou du motif de croissance. Ainsi, le même 30 procédé de surveillance de croissance peut être utilisé indépendamment de la cellule microbienne et/ou des agents antimicrobiens utilisés. Des procédés de réalisation du test AST sont décrits davantage ci-après.

Selon le second aspect de l'invention, de façon avantageuse, l'échantillon clinique (par exemple, une aliquote de test) peut être utilisé directement dans le test 5 AST, après un résultat positif dans l'étape (e). L'échantillon clinique/partie/aliquote de test/fraction d'aliquote, etc. auraient été soumis à la culture durant le temps où les étapes (d) et (e) ont été effectuées, et il n'est pas nécessaire de réaliser n'importe quelle autre sous- 10 culture avant l'étape (f). En effet, dans des modes de réalisation avantageux, il n'y a pas d'étape de sous-culture supplémentaire. En particulier, il n'y a pas d'étape de sous-culture dans un autre milieu de culture ou autre récipient de culture. Plus particulièrement, il n'y a pas d'étape de sous- 15 culture pour obtenir une culture pure d'un microorganisme avant l'AST. Ceci signifie qu'un test AST plus rapide peut être effectué.

De façon analogue à ceci, conformément au premier 20 aspect de l'invention, un test AST peut être effectué directement à l'aide de l'échantillon clinique (par exemple, l'aliquote de test), et il n'est pas nécessaire de réaliser n'importe quelle sous-culture avant ceci. En effet, dans des modes de réalisation avantageux, il n'y a pas d'autre étape 25 de sous-culture. En particulier, il n'y a pas d'étape de sous-culture dans un autre milieu de culture ou autre récipient de culture. Plus particulièrement, il n'y a pas d'étape de sous-culture pour obtenir une culture pure d'un microorganisme avant l'AST. Ceci signifie qu'un test AST plus 30 rapide peut être effectué.

De façon avantageuse, un test AST rapide est effectué. Ainsi, dans des modes de réalisation préférés des

procédés de la présente invention, le test AST (par exemple, le test AST de l'étape (f)) peut donner un résultat en 8, 7 ou 6 heures ou moins, par exemple en 4 ou 5 heures ou moins.

5 La surveillance ou l'évaluation de la croissance microbienne dans le test AST peut avoir lieu par surveillance de la croissance en continu ou à des intervalles sur une période de temps (par exemple, jusqu'à 4, 5, 6, 7 ou 8 heures), ou par comparaison de la croissance au moment où
10 la culture de croissance d'AST est initialisée (t_0) avec la croissance à un moment plus tardif (par exemple, jusqu'à 4, 5, 6, 7 ou 8 heures), ou en effet par comparaison de la croissance à au moins deux moments différents. Dans des modes de réalisation préférés, la croissance microbienne est
15 déterminée à plus d'un moment, à savoir à au moins deux moments.

Le procédé de l'invention peut être utilisé pour la détection et la caractérisation de n'importe quel
20 microorganisme. En général, des microorganismes cliniquement pertinents sont concernés. Tel qu'utilisé ici, le terme microorganisme englobe n'importe quel organisme qui peut tomber dans la catégorie de « microorganisme ». Bien que ce ne soit pas nécessairement le cas, les microorganismes
25 peuvent être unicellulaires ou peuvent avoir un stade de vie unicellulaire. Le microorganisme peut être procaryote ou eucaryote et comprendra généralement des bactéries, des archéobactéries, des champignons, des algues et des protistes, comprenant notamment des protozoaires. Sont
30 d'intérêt particulier les bactéries, qui peuvent être Gram positives ou Gram négatives ou Gram indéterminées ou Gram non sensibles, et les champignons.

En particulier, les genres cliniquement pertinents de bactéries comprennent *Staphylococcus* (comprenant *Staphylococcus* négatif pour la Coagulase), *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, 5 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Fusobacterium*, *Moraxella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Serratia*, *Streptococcus* (comprenant des *Streptococci* alpha-hémolytiques et bêta-hémolytiques), *Bacteroides*, *Yersinia* et 10 *Stenotrophomas*, et en effet n'importe quelles autres bactéries entériques ou coliformes. Les *Streptococci* bêta-hémolytiques comprendraient les *Streptococci* de Groupe A, Groupe B, Groupe C, Groupe D, Groupe E, Groupe F, Groupe G et 15 Groupe H.

Des exemples non limitatifs de bactéries Gram positives comprennent *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferei*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Staphylococcus agalactiae*, *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus salivarius*, *Staphylococcus sanguinis*, *Staphylococcus anginosus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus bovis*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Des exemples non limitatifs de bactéries Gram négatives 20 comprennent *Escherichia coli*, *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, 25 30

Enterobacter cloacae, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Morganella morganii*, *Bacteriodes fragilis*, *Acinetobacter baumannii* et *Proteus mirabilis*.

5

Des champignons cliniquement pertinents peuvent comprendre les levures, en particulier du genre *Candida*, et les champignons du genre *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Pneumocystis*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*, *Malassezia*, 10 *Trichosporon*, *Acremonium*, *Rhizopus*, *Mucor* et *Absidia*. Sont d'intérêt particulier *Candida* et *Aspergillus*. Des exemples non limitatifs de champignons comprennent *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliensis*, *Candida parapsilosis* et *Candida 15 krusei*.

Le terme « détecter » se réfère largement à n'importe quels moyens de détermination de la présence ou de l'absence d'un microorganisme. Ainsi « détecter » peut 20 comprendre la détermination, l'évaluation ou la mesure de n'importe quelle façon ou forme de savoir si un microorganisme est présent ou non - il peut comprendre les déterminations qualitatives, quantitatives ou semi-quantitatives.

25

Le terme « caractériser » signifie largement n'importe quels moyens de détermination d'informations sur la nature et/ou les propriétés du microorganisme, et comprend particulièrement l'identification du microorganisme. Plus 30 particulièrement, le microorganisme peut être identifié en termes au moins de son genre, et de préférence de son espèce. Dans certains cas, même l'identification au niveau de la souche peut être possible. Le procédé de l'invention permet

également avantageusement au microorganisme d'être caractérisé en termes de détermination de savoir s'il est sensible ou non, ou s'il est attendu être sensible ou non, à des agents antimicrobiens donnés, ou s'il démontre ou non une résistance ou est attendu ou non être résistant à n'importe quels agents antimicrobiens, par exemple par détermination de son profil de susceptibilité antimicrobienne. Ceci peut être effectué par test pour la présence de marqueurs de résistance moléculaire, notamment des variants génétiques ou des séquences génétiques particulières qui sont associées à, ou indicatrices de la résistance à un ou plusieurs agents antimicrobiens, ou classes d'agent antimicrobien. De tels tests moléculaires bien sûr ne déterminent pas de manière concluante que le microorganisme est sensible et ceci est effectué par un test AST, tel que le test AST de l'étape (f) dans le second aspect de l'invention, dans lequel l'effet de l'agent antimicrobien sur la croissance du microorganisme est testé directement.

Le terme « lyser » signifie détruire une cellule. En particulier, la cellule est détruite pour libérer le contenu cellulaire, comprenant en particulier l'acide nucléique. Ceci peut être réalisé par n'importe quels moyens, dont un vaste nombre sont connus dans l'état de la technique, par exemple par des mécanismes viraux, enzymatiques, mécaniques, électriques, chimiques, par la chaleur, par le froid ou osmotiques qui compromettent son intégrité, conduisant à la libération partielle ou totale des composants cellulaires dans la solution environnante.

30

L'échantillon clinique peut être n'importe quel échantillon clinique qui peut être obtenu à partir d'un sujet test, qui généralement sera un patient humain mais peut être

n'importe quel sujet humain ou animal, en général mammifère. Il peut être ainsi n'importe quel échantillon de tissu corporel, cellules ou fluide, ou n'importe quel échantillon dérivé du corps, par exemple un prélèvement par écouvillon, lavage, aspirat, ou rinçat, etc. Des échantillons cliniques appropriés comprennent, mais sans y être limités, le sang, le sérum, le plasma, les fractions sanguines, le fluide des articulations, l'urine, le sperme, la salive, les fèces, le liquide céphalo-rachidien, le contenu gastrique, les sécrétions vaginales, le mucus, un échantillon de biopsie tissulaire, les homogénats de tissu, les aspirats de moelle osseuse, des homogénats osseux, le sputum, les aspirats, un exsudat de lésion, les prélèvements d'écouvillon et les rinçats d'écouvillon, par exemple, un prélèvement par écouvillon nasopharyngé, les autres fluides corporels et similaires. Dans un mode de réalisation préféré, l'échantillon clinique est un échantillon de sang ou de dérivé du sang, par exemple du sérum ou du plasma ou une fraction sanguine.

20

Le microorganisme peut être n'importe quel microorganisme, en particulier n'importe quel microorganisme pathogène ou n'importe quel microorganisme provoquant une infection dans le corps, et ainsi le procédé peut être utilisé dans le contexte de la détection ou du diagnostic d'une infection microbienne dans le ou dans n'importe quelle partie du corps d'un sujet test (à savoir n'importe quelle infection microbienne) et la nature de l'échantillon clinique peut être déterminée en conséquence, par exemple, selon la présentation de symptômes de l'infection ou de l'infection présumée, ou l'état clinique général du sujet. Bien que n'importe quelle infection microbienne soit englobée, le procédé de l'invention a une utilité particulière dans la

détection ou le diagnostic de la septicémie, ou lorsqu'une septicémie est suspectée. Ainsi, l'échantillon clinique peut provenir d'un sujet ayant, ou étant présumé avoir, ou présentant un risque de, septicémie. Dans un tel cas,
5 l'échantillon sera généralement du sang ou un échantillon dérivé du sang. Typiquement, l'échantillon sera du sang.

Dans la première étape du procédé (étape (a)), l'échantillon est introduit dans un premier récipient de culture. Ceci est une étape standard qui peut être réalisée selon des procédures standards bien connues dans la technique et largement décrites dans la littérature. Le premier récipient de culture peut être n'importe quel récipient ou conteneur approprié pour la collecte d'un échantillon clinique et la culture de cellules microbiennes, par exemple, un tube, une bouteille, un flacon, etc. De préférence, le premier récipient de culture est un flacon de culture de sang. Les flacons de culture de sang sont bien connus dans la technique, et peuvent être, par exemple un flacon de culture de sang
10 BacT/ALERT (Biomerieux), un flacon de culture de sang Bactec (Becton Dickinson) ou un flacon de culture de sang VersaTrek (Thermo Fisher), ou en effet n'importe quel tube, flacon ou bouteille connu pour l'échantillonnage du sang, en particulier à des fins de culture pour détecter des
15 microorganismes.
20
25

Le second récipient de culture, à savoir où une partie de la culture d'échantillon clinique est retirée à partir du premier récipient de culture avant l'étape (c), peut comprendre n'importe quel récipient ou conteneur approprié pour la culture de cellules microbiennes, par exemple, une plaque, un puits, un tube, une bouteille, un flacon, etc. Le second récipient de culture peut de manière
30

pratique également être un flacon de culture de sang tel que décrit ci-dessus.

De manière pratique, le récipient de culture (par 5 exemple le premier ou second récipient de culture) peut être fourni avec le milieu de culture déjà contenu à l'intérieur. Cependant, le milieu de culture peut être fourni et introduit séparément dans le récipient de culture, soit avant, soit simultanément, soit après que l'échantillon clinique a été 10 ajouté.

Le milieu de culture peut être n'importe quel milieu approprié et peut être sélectionné selon la nature de l'échantillon clinique et/ou le microorganisme présumé, et/ou 15 l'état clinique du sujet, etc. De nombreux milieux de culture microbiens différents appropriés pour une telle utilisation sont connus. Typiquement, le milieu de culture peut contenir des nutriments suffisants pour favoriser la croissance rapide de microorganismes, comme cela est connu dans la technique. 20 Dans de nombreux cas, des milieux appropriés sont des milieux de croissance complexes comprenant des milieux tels qu'un bouillon de soja tryptique, le bouillon de Columbia, un bouillon de perfusion cœur-cerveau, le bouillon de Brucella, ainsi que des milieux de croissance à des fins générales 25 connus dans la technique, et peuvent comprendre l'addition de facteurs de croissance ou suppléments particuliers. Les milieux de culture sont disponibles sous diverses formes, comprenant des liquides, solides et suspensions, etc., et n'importe lesquels de ceux-ci peuvent être utilisés, mais de 30 façon pratique, le milieu sera un milieu liquide. Si le récipient de culture est un flacon de culture de sang prêt à l'emploi, tel que décrit ci-dessus, ces récipients peuvent contenir des milieux spécifiés spécialement modifiés pour

- 54 -

permettre à une large gamme de microorganismes de croître. Typiquement, un milieu fourni dans un flacon de culture de sang par un fabricant contiendra un agent ou un additif pour neutraliser la présence de n'importe quels antibiotiques présents dans un échantillon clinique prélevé à partir d'un sujet test. Des flacons contenant ou ne contenant pas de tels agents de neutralisation peuvent être utilisés, et des agents de neutralisation peuvent être ajoutés au récipient de culture si souhaité.

10

Tel que noté ci-dessus, une première aliquote de test pour les tests d'identification de l'étape (e) peut être retirée après une période de préculture durant le transport de l'échantillon clinique.

15

L'étape (b) comprend la préculture de l'échantillon clinique dans le premier récipient de culture durant le transit, et permet aux microorganismes présents dans l'échantillon de croître (à savoir de se multiplier), avant que le test moléculaire ait lieu. Dans le cas d'un échantillon de sang par exemple (par exemple dans un flacon de culture de sang), le nombre de cellules microbiennes est généralement attendu être faible et ainsi la préculture est avantageuse pour augmenter le nombre de cellules microbiennes disponibles pour le test moléculaire ou pour faciliter la récupération d'ADN microbien, etc.

Dans certains modes de réalisation de la présente invention, il peut être avantageux de détecter ou mesurer si une croissance microbienne a eu lieu ou non durant la préculture de l'échantillon clinique, par exemple avant l'introduction du premier récipient de culture dans le système de traitement d'échantillon clinique et/ou avant de

retirer une aliquote de test pour le test moléculaire. La croissance microbienne peut être détectée à l'aide de n'importe quel procédé pratique tel que décrit ici, comprenant la mesure turbimétrique, la détermination 5 colorimétrique, la détection de lumière, la diffusion de lumière, la mesure de pH, les mesures spectroscopiques et la détection fluorométrique.

Le retrait de l'aliquote de test dans l'étape (c) 10 peut avoir lieu par n'importe quels moyens pratiques, selon la nature du récipient de culture et la manière dont il est incubé. Par exemple, dans le cas d'un flacon de culture de sang, une aliquote peut simplement être retirée à l'aide d'une aiguille et d'une seringue. Selon une pratique clinique 15 et microbiologique normale, des étapes peuvent être réalisées pour éviter ou limiter la contamination, par exemple, ceci peut être réalisé dans des conditions aseptiques. Par exemple, le septum d'un récipient de culture, tel qu'un flacon de culture de sang, peut être nettoyé ou décontaminé, 20 de préférence avant de retirer une aliquote, et/ou après le retrait d'une aliquote.

Dans un mode de réalisation pratique, les moyens pour retirer l'aliquote de test (par exemple, l'aiguille, et 25 facultativement la seringue), peuvent être fournies sous une forme à utilisation unique, à savoir, un produit consommable. En d'autres mots, ils peuvent être jetables et non réutilisés.

30 L'étape (c) de retrait d'une aliquote de test tout en continuant la culture peut être réalisée plus d'une fois. En effet, pour effectuer les tests moléculaires de l'étape (e) et le test AST de l'étape (f) conformément au second

aspect de l'invention, deux aliquotes séparées seront habituellement prélevées et, dans chaque cas, la culture sera continuée. Tel que mentionné ci-dessus, cependant, une partie de l'aliquote prélevée pour la réalisation des tests moléculaires peut être retenue et mise en culture. Cette partie peut être utilisée pour des tests moléculaires répétés (par exemple, à un second moment) et/ou peut être utilisée dans le test AST. Cependant, des aliquotes séparées pour des tests moléculaires répétés peuvent également être prélevées, par exemple à des intervalles de temps espacés. Ainsi, un test moléculaire (étape (e)) peut être réalisé plus d'une fois. Dans un tel mode de réalisation, une aliquote peut être retirée directement après l'étape (b)(i) pour réaliser un test moléculaire initial après le transport de l'échantillon clinique (à savoir, lors de l'arrivée de l'échantillon clinique au laboratoire pour le test, ou lorsque l'échantillon clinique est sélectionné pour le test). Si le test moléculaire initial est négatif ou non complètement concluant par exemple, une seconde aliquote peut être retirée après une période de préculture pour réaliser un second test moléculaire. Ainsi, dans un mode de réalisation, un procédé selon le second aspect de l'invention peut comprendre les étapes suivantes :

- i) introduire un échantillon clinique dans un récipient de culture ;
- ii) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du récipient de culture dans un compartiment isolé thermiquement d'un conteneur pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon, le compartiment isolé thermiquement et le chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la

température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, et facultativement l'agitation mécanique du récipient de culture pour agiter par là l'échantillon durant le transport, permettant ainsi de précultiver l'échantillon clinique ;

5 iii) retirer une aliquote de test à partir dudit récipient de culture ;

10 iv) séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test et réaliser des tests d'acide nucléique tels que décrits dans l'étape (e) ci-dessus ;

15 v) alors que l'étape (iv) est en cours, cultiver ledit échantillon clinique dans ledit récipient de culture ;

15 vi) retirer une autre aliquote de test à partir dudit récipient de culture, et continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit récipient de culture ;

15 vii) séparer l'ADN à partir de ladite autre aliquote de test et effectuer des tests d'acide nucléique tels que décrits dans l'étape (e) ci-dessus ;

20 Si ce second test moléculaire (ou n'importe quel autre test moléculaire) est négatif, le récipient de culture peut être soumis à une autre culture. Ainsi, la culture du récipient de culture peut être continuée pour permettre à d'autres tests d'être effectués.

25 De manière similaire, dans un mode de réalisation du premier aspect de l'invention, une partie de l'aliquote de test prélevée pour réaliser un test moléculaire (par exemple, un test d'acide nucléique) peut être retenue et cultivée, et la partie retenue peut être utilisée pour des tests moléculaires répétés (par exemple, à un second moment). Cependant, des aliquotes séparées pour des tests moléculaires répétés peuvent également être prélevées, par exemple à des intervalles de temps espacés. Ainsi, un test moléculaire peut

être effectué plus d'une fois, par exemple une fois à la suite de l'étape (b)(i) du premier aspect de la présente invention, et à un autre moment après une période de culture. Selon ce mode de réalisation, le procédé comprend les étapes 5 (i)-(iii) indiquées ci-dessus et une étape de séparation de l'ADN à partir de l'aliquote de test et la réalisation d'un test d'acide nucléique, et alors que cette étape est en cours, de culture de l'échantillon clinique dans le récipient de culture. A la suite de cette période de culture, une autre 10 aliquote de test peut être retirée dudit récipient de culture (et facultativement la culture de l'échantillon clinique dans le récipient de culture est laissée se poursuivre), et l'ADN est séparé à partir de l'autre aliquote de test et un test d'acide nucléique est effectué tel que décrit ci-dessus.

15

Pour permettre à un test d'acide nucléique moléculaire (par exemple, les tests d'acide nucléique moléculaires de l'étape (e) du second aspect de l'invention) d'être réalisé, l'ADN est séparé à partir de l'aliquote retirée ou de la fraction d'aliquote retirée (dans l'étape 20 (d)). Il sera entendu bien sûr que l'ADN microbien est nécessaire pour les tests moléculaires et, selon la nature de l'échantillon clinique, il peut y avoir un nombre significatif de cellules provenant du sujet test présent, ce 25 qui peut compliquer ou interférer dans la séparation ou le test ultérieur. Plus particulièrement, l'ADN non microbien, par exemple l'ADN humain, présent dans les cellules du sujet test dans l'échantillon clinique peut rendre la détection et le test de l'ADN microbien difficiles, en particulier dans le 30 cas d'échantillons tels que le sang, où il y a beaucoup plus de cellules sanguines (en particulier des leucocytes) que de cellules microbiennes. En conséquence, il peut être souhaitable de séparer sélectivement, ou d'enrichir en, l'ADN

microbien à partir de l'Aliquote de test. En effet, le procédé peut facultativement comprendre une étape de séparation ou d'enrichissement de microorganismes ou de cellules microbiennes dans ou à partir de l'Aliquote de test,
5 par exemple avant ou simultanément à l'étape de séparation de l'ADN, ou de séparation de l'ADN microbien.

Des procédés appropriés pour enrichir les microorganismes dans l'échantillon peuvent comprendre la lyse
10 de n'importe quelles cellules non microbiennes présentes dans l'Aliquote, ou le retrait sélectif de cellules microbiennes à partir de l'Aliquote (à savoir la sélection positive ou négative de cellules microbiennes à partir de l'Aliquote). Des procédés pour réaliser ceci sont connus dans l'état de la
15 technique. Des procédés pour la lyse sélective de cellules non microbiennes pour l'enrichissement sélectif de microorganismes dans un échantillon, qui ne sont pas dépendants de la connaissance de l'identité des microorganismes, sont décrits par exemple dans
20 US 2013/0171615, US 2012/0231446, US 2010/0184210, US 7893251 et US 8481265, et des procédés pour le retrait sélectif de cellules eucaryotes à partir d'un échantillon sont décrits dans US 2005/0202487.

25 Les procédés de séparation de l'ADN sont connus dans l'état de la technique, et n'importe lequel des divers procédés différents connus et décrits peut être utilisé. D'une manière générale, ceux-ci mettent en jeu la lyse des cellules, qui peut être réalisée par divers moyens et diverses façons, et la récupération de l'ADN libéré, et de nouveau divers moyens et diverses procédures pour ceci sont connus et disponibles et n'importe lequel de ceux-ci peut être utilisé. L'étape de lyse peut dépendre de la nature des

microorganismes suspectés, bien que de nombreuses procédures puissent lyser les microorganismes en général.

Tel que mentionné ci-dessus, selon la nature de l'échantillon, de préférence cette étape met en jeu la séparation de l'ADN microbien, plus particulièrement la séparation sélective, ou l'enrichissement en, l'ADN microbien. Ceci peut généralement être effectué par la lyse sélective des cellules du sujet test dans l'échantillon, tout en laissant les cellules microbiennes intactes. De nombreuses procédures, et en effet des kits, sont connus et disponibles, lesquels peuvent réaliser ceci, par exemple provenant de Molzym (Allemagne). Par exemple, des cellules humaines, par exemple des cellules sanguines humaines, peuvent facilement être lysées, sans lyser les cellules microbiennes présentes dans l'aliquote. Ceci s'applique également à d'autres cellules humaines ou de mammifère qui peuvent être présentes, selon l'échantillon. La séparation, et en particulier la séparation sélective, de l'ADN microbien est préférée dans le cas d'un échantillon de sang ou de dérivé du sang.

Ainsi, n'importe quelles cellules dans l'échantillon clinique qui proviennent du sujet testé et qui sont présentes dans l'aliquote de test peuvent être lysées à l'aide des conditions de lyse qui ne lysent pas les cellules microbiennes. Par exemple, un réactif de lyse approprié, par exemple un tampon de lyse, peut être ajouté à l'aliquote de test. L'ADN, ou l'acide nucléique plus généralement, libéré dans cette première étape de lyse, peut être éliminé, par exemple par dégradation (par exemple, par une enzyme de dégradation de l'ADN, par exemple une DNase), et/ou par n'importe quel procédé qui peut séparer ou éliminer de l'ADN ou un acide nucléique à partir de l'échantillon et/ou séparer

n'importe quelles cellules microbiennes non lysées, par exemple un procédé de séparation tel que la filtration, la séparation sur colonne, la précipitation, la centrifugation, etc., bien que, dans un mode de réalisation, il s'agisse 5 d'une caractéristique préférée du procédé que celui-ci ne comprenne pas de centrifugation. Ainsi, dans un mode de réalisation, l'étape de la séparation de l'ADN ne comprend pas de centrifugation, et en effet, dans un mode de réalisation préféré supplémentaire, le procédé dans son 10 ensemble ne comprend pas de centrifugation. N'importe quelles enzymes, en particulier n'importe quelles enzymes de dégradation de l'ADN, utilisées dans ces étapes, peuvent être inactivées ou éliminées, par exemple par chauffage ou par addition 15 d'enzymes de dégradation de protéine supplémentaires.

Ensuite, les cellules microbiennes restant dans, ou provenant de, l'aliquote traitée (par exemple, le lysat provenant de la première étape de lyse) sont ensuite lysées 20 par introduction de conditions de lyse, par exemple par addition d'un réactif de lyse approprié (par exemple, un tampon de lyse) pour lyser les cellules microbiennes. De nombreux de tels tampons sont connus dans l'état de la technique et/ou disponibles dans le commerce, par exemple 25 auprès de Molzym (Allemagne). L'ADN microbien libéré dans la seconde étape de lyse microbienne peut ensuite être récupéré, par exemple séparé à partir du mélange réactionnel (lysat). Tel que mentionné ci-dessus, de nombreuses techniques sont disponibles pour ceci et n'importe laquelle de celles-ci peut 30 être utilisée. Dans un mode de réalisation préféré, cette étape ne comprend pas de centrifugation.

L'ADN récupéré, ou l'ADN microbien récupéré, est ensuite soumis aux tests moléculaires (par exemple, dans l'étape (e)). Il peut être souhaitable de dénaturer l'ADN à double brin, en particulier l'ADN microbien séparé ou enrichi à partir de l'Aliquote de test, avant la réalisation des tests d'acide nucléique moléculaires de l'étape (e). En outre, il peut être avantageux ou souhaitable (mais n'est pas nécessaire) de fragmenter l'ADN avant la mise en œuvre des tests moléculaires de l'étape (e). De telles étapes peuvent être effectuées par des procédés de routine connus dans l'état de la technique, par exemple, une fragmentation peut être réalisée mécaniquement, par chauffage ou par des procédés de dégradation enzymatique, par exemple à l'aide d'enzymes de restriction ou d'autres endonucléases.

15

Essentiellement, les tests moléculaires utilisent des sondes ou amorces d'acide nucléique qui sont conçues pour s'hybrider à des séquences d'acide nucléique microbien spécifiques, ou pour être capables d'amplifier sélectivement une séquence microbienne spécifique, et qui, sur la base du fait qu'elles s'hybrident ou non, ou sont étendues (par exemple, amorcent avec succès une réaction d'amplification), peuvent être utilisées pour détecter si un microorganisme particulier est présent ou non et s'il contient un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ou non. De tels tests d'acide nucléique et sondes d'hybridation ou amorces pour une utilisation dans ceux-ci, sont connus dans l'état de la technique et décrits dans la littérature.

30

Une sonde d'hybridation comprendra une séquence nucléotidique qui est capable de s'hybrider à une séquence cible souhaitée ou sélectionnée, de préférence de s'hybrider spécifiquement. Ainsi, elle peut comprendre une séquence qui

est complémentaire à une séquence cible. La complémentarité absolue ou à 100 % n'est pas requise tant que la sonde est capable de s'hybrider spécifiquement à la séquence cible en présence de séquences nucléotidiques non cibles. Par la 5 détection de l'hybridation, il peut être détecté si la séquence cible est présente ou non, et de nombreux formats d'essai d'hybridation à l'aide de différentes modalités pour la détection de l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique sont connus et peuvent être utilisés. D'une manière générale, 10 la détection de l'étape (e) peut avoir lieu par détection de la sonde d'hybridation.

Tel que discuté ci-dessus, la détection de la sonde 15 d'hybridation peut comprendre ou mettre en jeu l'amplification de la sonde d'hybridation. Ainsi, en addition à des sondes d'hybridation, une ou plusieurs amorces d'amplification pour les sondes d'hybridation peuvent être fournies.

20 Dans le cas de l'invention, la séquence cible est tout d'abord (par exemple, dans l'étape (e)(i) conformément au second aspect demande l'invention, ou l'étape (i) du test 25 d'acide nucléique conformément au premier aspect de l'invention) une séquence nucléotidique identificatrice d'un microorganisme, c'est-à-dire, une séquence nucléotidique qui est caractéristique d'un microorganisme particulier, par exemple d'un genre, d'une espèce ou d'une souche, et qui peut être utilisée comme base pour l'identification de ce microorganisme. Ainsi, la séquence nucléotidique 30 identificatrice peut être visualisée en conséquence comme un motif ou une signature, ou une séquence caractéristique d'un microorganisme particulier donné. Typiquement, elle peut être une séquence qui est unique à ce microorganisme (par exemple,

au niveau du genre, de l'espèce ou de la souche). Un certain nombre de telles séquences identificatrices ont été identifiées et rapportées et n'importe laquelle de ces séquences pourrait être utilisée. Par exemple, la séquence 5 cible peut être une séquence d'acide nucléique provenant du gène d'ARNr 16s. En variante, ce serait une question de routine d'identifier de tels motif/signature/séquences identificatrices, par exemple à l'aide d'outils bioinformatiques pour analyser les séquences génomiques 10 microbiennes, et pour concevoir des sondes d'hybridation appropriées sur la base de ceux-ci, comprenant des séquences capables de s'hybrider aux séquences identifiées.

En variante, plutôt que d'utiliser des sondes 15 d'hybridation, une ou plusieurs amorces peuvent être utilisées et un procédé à base d'amorce, par exemple un procédé à base d'extension d'amorce par polymérase, peut être utilisé pour détecter et identifier le microorganisme. Typiquement, ceci sera un procédé d'amplification, plus 20 communément une PCR, mais d'autres procédés d'amplification ou procédés d'extension d'amorce peuvent être utilisés, comprenant par exemple LCR, NASBA, MDA, etc. Une amorce ou un ensemble d'amorces peut s'hybrider à la séquence nucléotidique identificatrice, ou elle (elles) peut ou 25 peuvent s'hybrider d'une telle manière (par exemple, en la flanquant) qu'une séquence identificatrice peut être amplifiée. Le terme « amplifié » est utilisé largement dans ce contexte (voir également ci-dessus), pour signifier n'importe quel procédé de fourniture d'une copie (comprenant 30 une copie complémentaire) de la séquence identificatrice ou de marqueur et comprend des réactions d'extension d'amorce simples, et une amplification linéaire ainsi

qu'exponentielle. Pour la PCR, une paire d'amorces sera utilisée pour chaque séquence identificatrice microbienne.

Pour simplifier, les sondes d'hybridation ou 5 amorces pour l'utilisation dans l'invention peuvent être spécifiques pour (i) une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme ou (ii) une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne.

10

Ainsi, défini autrement, dans le procédé de l'invention tel que présenté ci-dessus, l'étape (e) du second aspect de l'invention, ou le test d'acide nucléique réalisé selon le premier aspect de l'invention, peut être exprimé 15 comme suit :

mettre en œuvre des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit 20 microorganisme, lesdits tests d'acide nucléique étant réalisés à l'aide de :

i) d'une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, chacune desdites sondes et/ou amorces étant spécifique pour une séquence 25 nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, chacune desdites sondes et/ou amorces étant 30 spécifique pour une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont

étée étendues (par exemple, une réaction d'amplification a eu lieu).

Tel que noté ci-dessus, l'étape de détection peut comprendre ou mettre en jeu l'amplification d'une sonde après qu'elle se soit hybridée à sa séquence nucléotidique cible. Tel que décrit plus en détail ci-après, l'amplification peut être conçue pour être dépendante de l'hybridation. Ainsi, seule une sonde qui s'est hybridée peut être amplifiée.

10

De cette façon, un ensemble ou un panel de sondes d'hybridation ou amorces peut être assemblé et/ou construit, lesquelles sont capables de s'hybrider à, ou d'amplifier, les acides nucléiques de microorganismes sélectionnés et ainsi de détecter si ce microorganisme est présent ou non dans l'aliquote de test (et par là dans l'échantillon). Par la détection du microorganisme qui est présent (à savoir, quelle sonde d'identification s'hybride ou quelle amorce/ensemble d'amorces est étendu ou amorce une réaction d'amplification), peut être identifié le microorganisme qui est présent dans l'échantillon. A titre d'exemple, les sondes d'hybridation ou amorces pour l'identification microbienne peuvent comprendre des sondes ou amorces chacune capable d'identifier spécifiquement l'un d'un ensemble sélectionné de microorganismes, par exemple, les pathogènes majeurs connus de la septicémie ou les plus courants. Par exemple, les listes d'espèces bactériennes et fongiques spécifiques fournies ci-dessus représentent approximativement 95 % des pathogènes de la septicémie les plus courants et peuvent constituer un panel de microorganismes représentatifs selon l'invention.

Ainsi, dans l'étape (i) ci-dessus (par exemple, étape (e)(i)), une multiplicité de sondes d'identification et/ou amorces (ou ensembles d'amorces) seront utilisées de manière avantageuse. Une multiplicité est largement définie 5 ici comme au moins deux, ou plus particulièrement, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 200, 300, 400 ou 500 ou plus. Ainsi que de multiples microorganismes différents pour l'identification, différentes 10 sondes ou amorces/ensembles d'amorces peuvent être utilisés pour un microorganisme donné à détecter, par exemple 2, 3, 4 ou 5 sondes ou amorces, ou plus, par microorganisme cible. Etant donné qu'un panel de microorganismes peut comprendre au moins 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ou plus (par exemple, jusqu'à 60, 70, 80, 90 ou 100 microorganismes), typiquement 15 un panel ou un ensemble d'au moins 30 ou plus, par exemple 50, 70, 80, 100, 200, 300, 400 ou 500 ou plus sondes d'identification ou amorces (ou ensembles d'amorces) sera utilisé. Selon les procédures connues dans l'état de la 20 technique, un test d'acide nucléique à base de sondes ou d'amorces peut utiliser des milliers, ou de nombreuses dizaines de milliers, de sondes ou amorces en multiplex et de telles procédures sont englobées par la présente invention.

En second lieu, dans l'étape (ii) ci-dessus (par 25 exemple, étape (e)(ii)) des procédés décrits ici, la séquence cible pour les sondes d'hybridation ou amorces est une séquence nucléotidique qui est un marqueur de résistance antimicrobienne. Un certain nombre de tels marqueurs ont été identifiés et rapportés dans l'état de la technique et des 30 sondes d'hybridation/amorces pour les détecter ont été imaginées. N'importe lesquelles de celles-ci pourraient être utilisées ou en variante d'autres sondes ou amorces peuvent être conçues sur la base de telles séquences de marqueurs

identifiées. En outre, des séquences de marqueurs supplémentaires peuvent être identifiées par des procédés de criblage de routine. Un marqueur de résistance antimicrobienne peut être une séquence nucléotidique qui code pour un composant d'un mécanisme de résistance, par exemple, une enzyme ou une protéine modifiée, ou il peut simplement être une séquence nucléotidique ou un variant de séquence qui a été identifié comme s'associant avec la résistance à un agent antimicrobien.

10

Au moyen d'un exemple, les β -lactamases représentent un mécanisme important de résistance contre les antibiotiques pour les bactéries et sont responsables de la résistance à certaines classes d'antibiotiques. L'émergence de bactéries capables de former des β -lactamases à spectre étendu (bactéries formant ESBL). ESBL représente un exemple récent d'un problème de résistance se développant rapidement. Des sondes ont été rapportées comme étant capables d'identifier des β -lactamases fortement diverses (Barisic et al., 2013, Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, 77(2), 118-125). D'autres marqueurs génétiques de résistance connus comprennent *mecA*, *mecc*, *vanA*, *vanB*, CTX-M, KPC, VIM, NDM et OXA-48. Des mutations de résistance à la ciprofloxacine ont été identifiées, par exemple dans *F. tularensis*, *B. anthracis* et *Y. pestis* résistants à un antibiotique, et sont disponibles.

Les sondes d'hybridation peuvent prendre diverses formes, et, dans leur forme la plus simple, comprennent une séquence nucléotidique capable de s'hybrider à la séquence cible et à une autre séquence ou fraction par laquelle elles peuvent être détectées, directement ou indirectement. Ainsi, une telle sonde peut être fournie avec un marqueur

directement ou indirectement détectable, par exemple un marqueur détectable spectrophotométriquement (par exemple, de manière fluorescente), ou une molécule ou fraction rapportrice qui peut prendre part à une réaction donnant un signal ou de génération de signal, par exemple, une enzyme, ou un substrat enzymatique ou cofacteur, ou qui peut être une étiquette d'affinité par laquelle la sonde peut être sélectivement marquée ou sélectivement isolée ou séparée après la réaction d'hybridation. Différentes formes de marquage et de sondes d'acide nucléique marquées sont largement connues et rapportées, par exemple, des balises moléculaires et autres sondes à base de FRET. Cependant, plutôt que détecter directement la présence d'une sonde hybridée au moyen d'un marqueur ou d'une fraction rapportrice fourni dans ou sur la sonde, la sonde peut être indirectement détectée, par exemple par détection d'un produit d'amplification de la sonde. Différents formats de sonde d'hybridation sont connus et n'importe lequel de ceux-ci peut être utilisé, par exemple, des sondes d'inversion moléculaire, des sondes scorpion et des sondes cadenas.

Des sondes d'inversion moléculaire et des sondes cadenas par exemple sont conçues pour être circularisées par ligature à la suite de l'hybridation à leur séquence cible, et la sonde circularisée résultante peut être détectée par amplification, par exemple par RCA.

Les sondes cadenas représentent un type préféré de sonde d'hybridation selon la présente invention. Les sondes cadenas ont été initialement décrites en 1994 (Nilsson et al, 1994, Science, 265, 2085-2088) et ont été depuis développées et largement utilisées dans la détection de diverses séquences nucléotidiques, et en effet plus largement en tant

que rapporteurs dans le dosage d'une large gamme de molécules (voir par exemple EP0745140, EP0964704, EP0951565 et Hardenbol et al. 2003. Nat. Biotechnol. 21, 673-678). Les sondes cadenas comprennent des séquences à leurs extrémités 5' et 3' qui peuvent s'hybrider à une séquence nucléotidique cible. Dans un mode de réalisation, les extrémités 5' et 3' des sondes cadenas peuvent s'hybrider à ladite séquence nucléotidique de telle sorte qu'elles sont directement adjacentes l'une à l'autre. Dans un autre mode de réalisation, les extrémités 5' et 3' des sondes cadenas peuvent s'hybrider à ladite séquence nucléotidique de telle sorte qu'elles ne sont pas directement adjacentes l'une à l'autre et l'espace intermédiaire peut être rempli, soit par extension par polymérase de l'extrémité 3' hybridée, soit par un oligonucléotide de remplissage de lacune. Les extrémités sont ensuite ligaturées ensemble pour former un cercle d'acide nucléique qui peut ultérieurement être détecté, de façon pratique par des procédés à base d'amplification par cercle roulant (RCA). La double reconnaissance (deux régions d'hybridation cibles) ainsi que l'exigence pour la ligature signifient que les sondes cadenas sont fortement spécifiques et bien adaptées pour détecter des séquences uniques dans un arrière-plan génomique complexe. L'approche de circularisation unimoléculaire et la détection à base de RCA des sondes circularisées se prêtent bien à la détection multiplexée, et un grand nombre de sondes peuvent être utilisées en combinaison et amplifiées ensemble sans problèmes d'interférence.

Cependant, bien que la RCA soit un procédé préféré pour la détection d'une sonde cadenas circularisée, l'invention n'est pas limitée à ceci et d'autres procédés d'amplification, comprenant par exemple la PCR, ou autres

procédés de détection, par exemple basés sur la détection sélective d'acides nucléiques circulaires par opposition à des acides nucléiques linéaires, peuvent être utilisés.

5 Les enzymes polymérases de déplacement de brin appropriées pour la RCA sont connues, par exemple la polymérase Φ-29.

10 L'amplification d'une sonde cadenas circularisée par RCA conduit à la formation d'un produit de RCA concatémérique comprenant plusieurs centaines de répétitions du complément de la séquence de sonde cadenas. Dans un mode de réalisation de la présente invention, un produit de RCA peut être détecté par hybridation d'oligonucléotides de 15 détection marqués par fluorescence.

20 Puisque la réaction de RCA est linéaire, et ainsi a une faible force d'amplification, un certain nombre de procédés ont été développés, lesquels peuvent améliorer l'amplification et augmenter le signal provenant d'une réaction de RCA, comprenant par exemple des procédés RCA hyper-ramifiés tels que décrits par Lizardi (US 6 183 960 et US 6 143 495). N'importe lequel de ceux-ci peut être utilisé. Le produit de RCA peut également être amplifié davantage par 25 PCR, ou en effet n'importe quel autre procédé d'amplification d'acide nucléique ou n'importe quel procédé d'amplification de signal peut être utilisé.

30 Un procédé particulièrement utile pour améliorer l'amplification par RCA est l'amplification cercle-à-cercle (C2CA). Ceci est décrit dans Dahl et al, 2004, PNAS USA, 101, 4548-4553 et WO 03/012199. C2CA met en jeu le clivage du produit d'amplification en cercle roulant (RCP)

concatémérique à partir d'une première réaction de RCA en monomères (par exemple, chacun correspondant à une répétition en tandem du concatémère, à savoir une copie complémentaire de la sonde cadenas circularisée) et ensuite la recircularisation des monomères, chacun d'entre eux dans un autre cercle qui peut être utilisé comme la matrice dans une autre réaction de RCA (à savoir, un autre cycle de RCA). Ceci peut être répété une ou plusieurs fois. La répétition de RCA conduit à l'amplification du signal.

10

Le clivage du RCP peut être obtenu par l'hybridation d'un oligonucléotide à une séquence (séquence de site de restriction) présente dans chaque répétition (monomère) du produit de RCA pour créer un site de clivage de restriction à double brin ou de reconnaissance et le clivage par une enzyme de restriction pour cliver le produit en monomères. Le même oligonucléotide, par exemple ajouté en excès, peut être utilisé comme matrice de ligature pour la circularisation des monomères libérés par le clivage. Une étape de dénaturation peut être comprise après clivage pour libérer des monomères à simple brin, qui sont disponibles pour l'hybridation à un oligonucléotide non clivé ou ajouté en excès.

25

Une modification de la réaction de C2CA est décrite dans notre demande de brevet britannique co-pendante N°1321123.0 déposée le 29 Novembre 2013, incorporée ici par référence. Dans cette procédure de C2CA modifiée, l'efficacité du second cycle ou n'importe quel cycle ultérieur de RCA est améliorée par la réduction de la taille des monomères circularisés, de telle sorte que la matrice circulaire pour le second cycle de RCA est réduite en taille par comparaison avec la première matrice de RCA (ici la sonde

cadenas circularisée), et par conséquent la vitesse des secondes réactions de RCA (et ultérieures) peut être accrue. Divers moyens de clivage du RCP de telle sorte que les monomères libérés sont réduits en taille ou pour autrement 5 effectuer une étape de réduction de taille sur les monomères sont décrits dans la demande co-pendante.

D'autres façons d'amplifier le signal provenant d'une réaction de RCA par réalisation d'une seconde réaction 10 de RCA ont également été rapportées et n'importe laquelle de celles-ci peut être utilisée. Un tel procédé est le soi-disant procédé superRCA (sRCA) d'Olink AB décrit dans WO 2014/076209. Dans cette procédure, une seconde réaction de RCA est réalisée, laquelle est dépendante d'une première 15 réaction de RCA, mais qui n'amplifie pas le premier produit de RCA. Le second produit de RCA reste physiquement attaché au premier produit de RCA, de façon que le signal provenant du second produit de RCA est localisé au niveau du premier produit de RCA. Par utilisation d'une amorce de RCA qui est 20 hybridée (directement ou indirectement) au premier produit de RCA pour amplifier un second cercle de matrice de RCA, un second produit de RCA peut être généré par extension de l'amorce de RCA, qui, par l'intermédiaire de l'hybridation de l'amorce, est hybridé, et ainsi, attaché au premier produit 25 de RCA. Puisque le premier produit de RCA est un concatémère comprenant des copies complémentaires à répétition en tandem du cercle de matrice pour la première réaction de RCA, l'amorce de RCA pour le second RCA se liera aux copies répétées de sa séquence de liaison d'amorce apparentée, 30 répétées tout au long du premier produit de RCA. En d'autres termes, le premier produit de RCA comprendra des sites de liaison répétés pour l'amorce de RCA pour le second RCA, un dans chacune des répétitions en tandem (« monomères » du

concatémère). Chacune de telles amorces peut amorcer une seconde réaction de RCA, conduisant à une amplification accrue, plus que linéaire.

5 Le RCP d'une réaction de RCA ou de C2CA peut être détecté directement, tel qu'indiqué ci-dessus, par exemple par des moyens d'oligonucléotides de détection marqués qui peuvent s'hybrider à des séquences dans les répétitions en tandem dans le RCP ou par incorporation de nucléotides
10 marqués dans le RCP, ou des monomères libérés à partir d'un RCP peuvent être détectés.

15 Un RCP, étant un très long concatémère d'acide nucléique (comportant typiquement 500-1000 copies de la séquence en cercle de matrice), s'affaisse en un « blob » amorphe à hélice aléatoire ou une balle d'ADN, qui peut facilement être détecté, et en effet visualisé. Ainsi, de tels « blobs » peuvent être imaginés ou détectés microscopiquement ou par n'importe quels autres moyens
20 pratiques, pour détecter (indirectement) l'hybridation des sondes cadenas à leurs cibles (et leurs ligature et détection ultérieures par RCA/C2CA). D'autres moyens de détection du RCP existent également, par exemple par cytométrie de flux, ou par capture du RCP sur un support solide et sa détection
25 par des moyens d'oligonucléotides de détection marqués ou autres moyens de marquage, par exemple des oligonucléotides marqués incorporés ou des marqueurs ou colorants d'acide nucléique, etc.

30 La détection d'un « blob » de RCP fournit un moyen pratique de détection de molécule unique amplifiée (ASMD). L'utilisation d'un tel procédé à base de C2CA et le comptage de « blobs » de RCP pour détecter des bactéries et des spores

est décrit par Göransson et al., 2012 PLOS one, 7(2), e31068 et un tel procédé peut être utilisé selon la présente invention. La concentration ou l'enrichissement du marqueur dans le « blob » de RCP signifie qu'il y a une forte 5 concentration de marqueur dans le « blob » par comparaison avec la solution environnante. Ceci élimine le besoin pour des lavages et permet à des procédés homogènes d'être utilisés - les produits réactionnels peuvent facilement être détectés dans une cellule à écoulement, par exemple tel que 10 décrit par Jarvius et al., 2006, Nature Methods, 3, 725-727.

En variante, plutôt que de détecter le concatémère de RCP tel quel, le RCP peut être clivé en des monomères et les monomères peuvent être détectés. A nouveau, ceci peut 15 être effectué au moyen d'un marqueur incorporé directement dans les monomères, ou par hybridisation d'oligonucléotides de détection aux monomères par exemple, tel que décrit ci-dessus, ou conformément aux principes bien connus dans l'état de la technique. Par exemple, des monomères peuvent être liés 20 sur un micro-réseau et les monomères liés au réseau (hybridés) peuvent être détectés par hybridation des oligonucléotides de détection marqués. Ainsi, un réseau peut être fourni, lequel porte (par exemple, par dépôt sur) des oligonucléotides qui sont capables de se lier (s'hybrider) 25 aux monomères de RCP. Les oligonucléotides du réseau peuvent être conçus pour être complémentaires aux monomères de RCP et peuvent être couplés de façon covalente au substrat de réseau par l'intermédiaire de groupes amine, thiol ou époxyde ou par n'importe quelle autre chimie de couplage connue, ou ils 30 peuvent être synthétisés *in situ* sur le réseau à l'aide de techniques connues, par exemple la photolithographie. Un tel réseau peut ensuite être balayé ou imagé et analysé, à nouveau selon des procédés bien connus dans l'état de la

technique. Ainsi, il peut être détecté qu'une sonde cadenas particulière s'est hybridée ou non à sa cible et, par conséquent, ligaturée et amplifiée, par détection qu'un monomère de RCP particulier s'est hybridé ou non au réseau.

5

Ainsi, dans certains modes de réalisation de la présente invention, des procédés à base de phase solide peuvent être utilisés. Un support solide peut être employé dans la mise en œuvre de divers stades ou étapes du procédé.

10 Par exemple, en addition ou en variante à la détection de réseau possible de monomères de RCP discutés ci-dessus, une phase solide peut être utilisée dans les étapes plus précoce du procédé. Dans un tel mode de réalisation, l'ADN cible provenant de ou dans l'ADN séparé à partir de l'aliquote de
15 test pour l'utilisation dans le test moléculaire peut être immobilisé sur un support solide. Ainsi, les fragments d'ADN ou les molécules d'ADN qui peuvent comprendre les séquences nucléotidiques qui sont les cibles pour les tests moléculaires à mettre en œuvre (par exemple, dans l'étape (e)
20 selon le second aspect de l'invention), peuvent être sélectivement capturés à partir de l'ADN séparé (par exemple, de l'étape (d) selon le second aspect de l'invention) à l'aide de sondes de capture, par exemple avant ou au même moment que le test moléculaire. Les sondes de capture peuvent
25 être utilisées, lesquelles s'hybrident à l'ADN cible (à des sites distincts des sites d'hybridation pour l'identification d'acide nucléique et les sondes ou amorces de détection de résistance). Les sondes de capture peuvent être ajoutées à l'ADN séparé ou enrichi, par exemple avant ou en même temps
30 que les sondes ou amorces d'identification et de détection de résistance. Les sondes de capture peuvent être immobilisées ou fournies avec des moyens pour l'immobilisation, de telle sorte qu'elles peuvent être immobilisées après la liaison à

l'ADN cible. De tels moyens pour l'immobilisation peuvent comprendre, par exemple, une molécule d'affinité capable de se lier à son partenaire de liaison apparenté, fournie sur un support solide. Au moyen d'un exemple représentatif, la sonde de capture peut être biotinylée, pour la liaison à la streptavidine ou à l'avidine (ou un variant de celles-ci) qui est couplée au support solide. N'importe quel support solide pratique peut être utilisé, tel que connu dans l'état de la technique. Par exemple, un support solide peut comprendre un micro-réseau, une membrane de transfert, un gel, une lame de microscope, un puits, un tube ou autre conteneur ou récipient, ou une bille ou une particule, par exemple une bille ou une particule en verre, en polymère, en matière plastique ou magnétique. Une molécule d'ADN cible peut facultativement être immobilisée sur un support solide directement. Ainsi, dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, une molécule d'ADN cible peut être immobilisée sur un support solide conjugué à la streptavidine par l'intermédiaire d'un oligonucléotide de capture biotinylé. Dans un mode de réalisation alternatif de la présente invention, une molécule d'ADN cible peut être biotinylée et immobilisée sur un support solide conjugué à la streptavidine.

Alors que des tests moléculaires (par exemple, les tests moléculaires de l'étape (e) dans le second aspect de l'invention) sont réalisés, le premier récipient de culture contenant l'échantillon clinique (ou le second récipient de culture contenant la partie de celui-ci) est maintenu en culture. Tel qu'indiqué ci-dessus, la culture met en jeu simplement l'incubation du récipient de culture dans des conditions appropriées pour, ou conduisant à, la croissance microbienne. Ainsi, cette étape peut être effectuée tel

qu'indiqué pour la préculture ci-dessus. Cette étape signifie que, si une identification microbienne positive n'est pas obtenue à partir des tests moléculaires (par exemple, à partir de l'étape (e)), l'échantillon est disponible pour une culture traditionnelle sur la base de protocoles d'identification basés sur des tests phénotypiques et/ou biochimiques classiques, ou en effet pour un test ID supplémentaire par n'importe quels autres moyens - ces tests ne sont pas retardés puisque la culture est en cours, et un autre échantillon clinique n'a pas besoin d'être prélevé, ou une autre culture d'être commencée. En effet à ce moment, si aucun microorganisme n'est identifié dans les tests moléculaires, par exemple dans l'étape (e), alors la culture peut être continuée telle quelle, ou le récipient de culture peut être transféré dans un autre système de culture (par exemple, un système de culture automatisé ou armoire automatisée conçu pour l'identification microbienne et facultativement également le test de susceptibilité antimicrobienne). Après une période de culture appropriée, de tels tests ID supplémentaires et également des tests de susceptibilité peuvent être effectués, les derniers par exemple par des moyens de test AST classiques, par exemple par des cultures de dilution de bouillon à trouble évalué ou des tests de diffusion sur disque pour déterminer les CMI.

25

Dans le second aspect de l'invention, si un microorganisme est identifié dans l'Aliquote de test, un test de susceptibilité antimicrobienne est effectué sur l'échantillon clinique cultivé qui a été maintenu en culture dans l'étape (c). De façon pratique, ceci peut mettre en jeu le retrait ou le prélèvement d'une autre aliquote (par exemple, une seconde aliquote ou une aliquote supplémentaire, selon le nombre d'aliquotes qui a été retiré pour le test

moléculaire) à partir du récipient de culture (le premier ou second récipient de culture), et la mise en œuvre d'un test AST sur celle-ci.

5 Cependant, dans le premier aspect de l'invention, un test de susceptibilité antimicrobienne peut être effectué sans réaliser d'abord un test moléculaire et identifier un microorganisme, et un tel test peut être effectué sur l'échantillon clinique cultivé obtenu à partir de l'étape 10 (b) (i) ou de l'étape (c). Une aliquote de test peut par conséquent être retirée à partir du récipient de culture à ce stade et sans d'abord mettre en œuvre n'importe quels autres tests, et un test AST peut être effectué.

15 Les procédés de l'invention peuvent également comprendre une autre étape à ce stade d'enrichissement de l'aliquote ou de l'échantillon clinique cultivé pour des microorganismes. Des procédures appropriées pour ceci sont discutées ci-dessus, et peuvent comprendre le retrait ou la 20 séparation de cellules non microbiennes (à savoir, des cellules du sujet test) à partir de l'aliquote/de l'échantillon cultivé. Dans un mode de réalisation, les cellules microbiennes peuvent être séparées, par exemple, par filtration.

25

Des conditions reconnues et prescrites pour le test AST existent, et peuvent être suivies de façon que des résultats facilement comparables puissent être obtenus, lesquels sont comparables à, ou peuvent être comparés avec, 30 des tests effectués dans d'autres laboratoires. Ceci peut mettre en jeu par exemple l'utilisation d'un milieu prescrit et de conditions de culture prescrites. Ainsi, l'autre aliquote retirée (ou fraction d'aliquote/restant, etc.) pour

le test AST, ou des microorganismes séparés ou enrichis à partir de celle-ci, peuvent être transférés dans un milieu approprié pour la culture microbienne, par exemple un milieu de Mueller-Hinton (milieux MH), avant le début du test de 5 susceptibilité antimicrobienne. Les microorganismes peuvent être mis à croître en présence d'une diversité d'agents antimicrobiens pour déterminer leur susceptibilité à un agent antimicrobien donné. Selon la présente invention, les agents antimicrobiens sont sélectionnés sur la base de l'identité du 10 microorganisme, et sur la nature de n'importe quels marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne identifiés à l'intérieur du microorganisme. Les agents antimicrobiens et les quantités à utiliser peuvent également être sélectionnés selon la pratique clinique actuelle, par exemple selon 15 laquelle les agents antimicrobiens sont actuellement utilisés en pratique pour traiter le microorganisme identifié, de sorte que la susceptibilité du microorganisme au traitement antimicrobien de choix accepté ou reconnu actuellement peut être évaluée. Ainsi, les agents antimicrobiens peuvent être 20 sélectionnés sur la base de ceux connus comme étant efficaces contre le microorganisme identifié, ou ceux actuellement utilisés en pratique pour traiter le microorganisme, et à l'exclusion de n'importe quels agents auxquels une résistance pourrait être attendue sur la base de la présence de 25 marqueurs de résistance, ou de tels agents pourraient être inclus et les quantités utilisées pourraient être sélectionnées pour permettre la détermination d'une quantité ou concentration de l'agent antimicrobien qui peut être efficace, malgré la présence du marqueur de résistance. Des 30 agents antimicrobiens sont ajoutés au milieu de croissance à une plage de concentrations ou quantités finales. Dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, une

dilution en série de l'agent antimicrobien peut être réalisée.

5 L'étape de croissance, ou culture, de l'échantillon/des microorganismes provenant de celui-ci dans le test AST peut avoir lieu par n'importe quels moyens connus ou pratiques. Des cultures en phase solide ou liquide peuvent être utilisées.

10 Ainsi par exemple, dans un mode de réalisation préféré, l'échantillon/les microorganismes peuvent être cultivés sur ou dans une plaque ou un autre milieu solide contenant l'agent antimicrobien et la croissance microbienne peut être déterminée par visualisation (par exemple, imagerie) des microorganismes (à savoir, l'imagerie de la plaque, etc.). Ainsi, la culture est visualisée ou imagée directement comme moyens de surveillance ou d'évaluation de la croissance. En conséquence, selon un mode de réalisation préféré, les cultures sont analysées directement pour surveiller/évaluer la croissance. Par exemple, les cultures peuvent être mises à croître dans les puits d'une plaque et les puits peuvent être imaginés.

25 En variante, des échantillons (ou aliquotes) peuvent être retirés (ou prélevés) à partir des cultures, à des intervalles, ou à différents moments, et les échantillons retirés (aliquotes) peuvent être analysés pour la croissance microbienne. Ceci peut être effectué par n'importe quels moyens, comprenant par exemple des moyens de tests moléculaires, par exemple des tests à base d'acide nucléique. Ainsi, des sondes et/ou amorces de détection peuvent être utilisées, lesquelles se lient aux cellules microbiennes ou à des composants libérés ou séparés à partir de cellules

microbiennes. Ceci peut comprendre par exemple des sondes ou amorces d'acide nucléique telles que décrites ci-dessus pour le test d'identification de l'étape (e). Dans d'autres modes de réalisation, les cellules microbiennes peuvent être 5 détectées directement, par exemple par coloration, tel que décrit plus en détail ci-après.

Chaque agent antimicrobien est, de préférence, utilisé à au moins une concentration, en plus d'un témoin 10 positif, dans lequel le microorganisme est laissé croître en l'absence d'un agent antimicrobien quelconque. Par exemple, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou plus concentrations d'un agent antimicrobien sont utilisées. Les concentrations utilisées dans une série de dilutions peuvent varier d'un facteur deux 15 entre des concentrations respectives.

Le terme antimicrobien comprend n'importe quel agent qui tue des microorganismes ou inhibe leur croissance. Les agents antimicrobiens de la présente invention peuvent en 20 particulier comprendre des antibiotiques et des antifongiques. Des agents antimicrobiens peuvent être microbicides ou microbiostatiques. Diverses classes différentes d'antibiotiques sont connues, comprenant des antibiotiques actifs contre les champignons, ou en 25 particulier des groupes de champignons et n'importe lequel ou la totalité de ceux-ci peut être utilisé. Les antibiotiques peuvent comprendre des antibiotiques bêta-lactame, céphalosporines, polymyxines, rifamycines, lipiarmycines, quinolones, sulfonamides, macrolides, lincosamides, 30 tétracyclines, aminoglycosides, lipopeptides cycliques, glycyclcyclines, oxazolidinones, lipiarmycines ou carbapénam. Des antifongiques préférés de la présente invention peuvent

comprendre des polyènes, des imidazoles, des triazoles et des thiazoles, des allylamines ou des échinocandines.

Ainsi, la susceptibilité antimicrobienne peut être déterminée par culture de l'Aliquote retirée (ou fraction d'Aliquote, etc.) ou de l'échantillon clinique cultivé provenant de l'étape (c) dans le second aspect de l'invention, ou l'échantillon clinique pré-cultivé provenant de l'étape (b)(i) ou l'échantillon clinique cultivé provenant de l'étape (c) dans le premier aspect de l'invention, ou des microorganismes séparés ou enrichis à partir de ceux-ci, et l'analyse des cultures d'AST sur une plage de temps. En ce qui concerne l'étape de culture ci-dessus, la culture pour l'AST peut avoir lieu à n'importe quelle température qui favorise la croissance microbienne, par exemple entre environ 20°C et 40°C, ou 20 à 37°C, de préférence entre environ 25°C et 37°C, de façon davantage préférée entre environ 30°C et 37°C ou 30 à 35°C. Dans un mode de réalisation, les cultures d'AST peuvent être cultivées à environ 35°C. Les cultures d'AST peuvent être analysées à de multiples moments pour surveiller la croissance microbienne. Par exemple, les cultures peuvent être analysées aux moments 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 heures après l'initialisation de la culture. Une culture peut être analysée immédiatement après l'initialisation de la culture, où $t = 0$. Les cultures peuvent également être analysées à des périodes de temps au-delà de 24 heures après l'initiation de la culture. Typiquement, les cultures peuvent être analysées à 0, 1, 2, 3, 4, 6 et 24 heures après l'initiation de la culture. Cependant, les résultats obtenus et rapportés dans les Exemples ci-après montrent que des temps d'incubation courts peuvent être suffisants pour détecter la croissance

microbienne différentielle, par exemple 4 heures. Ainsi, un temps d'incubation total plus court allant jusqu'à 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2 heures peut également être utilisé, par exemple une analyse toutes les heures ou toutes les 2 heures ou 5 90 minutes. Tel que noté ci-dessus, les cultures sont généralement analysées à au moins deux moments, par exemple à au moins deux moments allant jusqu'à 4, 5 ou 6 heures de culture.

10 La croissance microbienne est surveillée durant le test de susceptibilité antimicrobienne. De nombreux procédés pour la surveillance de la croissance microbienne sont connus et sont utilisés dans les tests AST, par exemple comprenant la mesure turbimétrique, la détermination colorimétrique, la 15 détection de lumière, la diffusion de lumière, la mesure du pH, les mesures de spectroscopie et la détection fluorimétrique. N'importe laquelle de celles-ci peut être utilisée. Cependant, selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, la croissance peut être détectée et 20 évaluée par détermination ou évaluation du nombre et/ou de la quantité et/ou de la taille et/ou de l'aire de cellules microbiennes dans l'échantillon par des méthodes d'imagerie. Tel que noté ci-dessus, les cellules microbiennes peuvent comprendre des cellules en colonies et/ou en agrégats. Ceci 25 peut être réalisé par évaluation ou détermination du nombre ou de la quantité de microorganismes présents dans l'échantillon avant et/ou après la croissance en présence d'agents antimicrobiens par n'importe lequel des procédés connus pour mesurer ou détecter des microorganismes. Une 30 telle détermination peut mettre en jeu la détermination du nombre et/ou la taille de cellules microbiennes, agrégats et/ou colonies. Aussi, des techniques pour ceci sont connues et disponibles. Ainsi, la croissance peut être mesurée par

surveillance du nombre et/ou la quantité et/ou la taille de microorganismes et/ou cellules microbiennes et/ou colonies et/ou agrégats dans un échantillon au cours du temps. Ceci peut être mesuré directement ou indirectement. Le nombre ou 5 la quantité de microorganismes dans un échantillon peut être mesuré directement par hémocytométrie, cytométrie de flux ou microscopie automatisée. Les microorganismes peuvent être fixés et/ou perméabilisés avant la détection. En variante, les microorganismes peuvent être détectés dans des conditions 10 in vivo. Des procédés pour le test AST par surveillance du comptage de cellules bactériennes à l'aide de la cytométrie de flux sont décrits dans Broeren et al., 2013, Clin. Microbiol. Infect. 19. 286-291. Des procédés pour la réalisation de tests AST dans lesquels les bactéries sont 15 mises en croissance et énumérées par microscopie automatisée dans des cassettes fluidiques à multicanaux sont décrits par Price et al. 2014, J. Microbiol. Met. 98, 50-58 et par Metzger et al., 2014. J. Microbiol. Met. 79, 160-165, et par Accelerate Diagnostics (voir par exemple WO 2014/040088 A1, 20 US 2014/0278136 A1 et US 8 460 887 B2). Dans ces procédés, les bactéries sont immobilisées et cultivées sur une surface, et les bactéries individuelles et/ou colonies individuelles sont évaluées pour la viabilité et/ou la croissance (comprenant la mesure de la croissance de colonie) par 25 imagerie de la surface à au moins deux moments. De tels procédés peuvent être utilisés conformément aux exemples de la présente invention. D'autres procédés connus sont tels que décrits par Fredborg et al, J Clin Microbiol. 2013 Jul ; 51(7) : 2047-53, et par Unisensor (US 8780181) où les 30 bactéries sont imagées en solution à l'aide d'une microscopie sur fond clair par prise d'une série d'images empilées (plans d'objet) de la solution, et le comptage des bactéries présentes dans l'échantillon.

Alors que n'importe lequel des procédés basés sur l'utilisation de l'imagerie pour surveiller la croissance microbienne peut être utilisé, les procédés de l'invention ne reposent de préférence pas sur le comptage de cellules individuelles ou sur la surveillance de la croissance de cellules individuelles ou colonies individuelles (par exemple, sur la surveillance d'une augmentation de taille d'une cellule individuelle ou d'une colonie, par exemple 5 selon les procédés d'Accelerate Diagnostics Inc). Ainsi, la présente invention n'est pas limitée à (et dans des modes de réalisation préférés ne met pas en jeu) l'utilisation d'une position fixe pour l'imagerie d'une culture d'AST ou d'un échantillon de culture d'AST. Plutôt, il est préféré selon la 10 présente invention de surveiller la croissance en vrac de cellules dans la culture d'AST ou l'échantillon de culture, par exemple par l'imagerie de cellules en vrac dans le champ de vision. La quantité (par exemple, l'aire) de matière 15 cellulaire microbienne (biomasse) dans le champ de vision peut être déterminée par imagerie. Les cellules/la biomasse microbienne peuvent être détectées directement (par exemple, par le microscope ou la caméra, etc.) par exemple à l'aide 20 d'une microscopie sur fond clair ou les cellules microbiennes peuvent être colorées pour la détection, par exemple par ajout d'un colorant à la culture d'AST ou à l'échantillon de 25 culture après la période de temps prédéterminée ou requise de croissance.

Dans un autre mode de réalisation particulier, les 30 cultures d'AST ou échantillons de culture peuvent être imagés ou visualisés directement sans immobiliser les cellules microbiennes, par exemple sans appliquer une force, telle

qu'une électrophorèse, pour localiser les cellules à un emplacement ou une surface de détection pour l'imagerie.

Dans de tels procédés d'imagerie, des algorithmes peuvent être appliqués pour déterminer une valeur pour la quantité de croissance microbienne à partir des images selon des procédés et principes bien connus dans la technique. Ainsi, des méthodes statistiques peuvent être appliquées aux images de cellules microbiennes, sur la base du nombre, de la taille et/ou de l'aire de matière cellulaire microbienne/biomasse dans les images (par exemple, la quantité de toute la matière cellulaire microbienne dans l'image/champ de vision, par exemple la matière cellulaire totale imagée). Des algorithmes peuvent être écrits pour prendre en compte les différents motifs de croissance et/ou différentes morphologies, sur la base de l'identité du microorganisme et de l'agent antimicrobien présent dans la culture.

De tels procédés de comptage ou d'imagerie permettent une analyse phénotypique numérique du microorganisme dans le test AST. Des données ont été obtenues, lesquelles montrent que de telles déterminations phénotypiques numériques délivrent une valeur de CMI similaire à celle de techniques de référence (par exemple, une dilution de micro-bouillon).

Un avantage particulier d'utilisation de tels procédés est que le test de susceptibilité antimicrobienne peut être effectué sur des échantillons comprenant une large gamme de concentrations ou quantités de microorganismes, et il n'est pas nécessaire d'utiliser un titre microbien standardisé avant la réalisation du test de susceptibilité

antimicrobienne. Une caractéristique utile de la présente invention est l'aptitude à utiliser différentes concentrations de microorganismes. Un échantillon comprenant au moins 10^3 CFU/ml peut être utilisé dans les procédés des échantillons, par exemple des échantillons comprenant au moins 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ou 10^8 ou 10^9 CFU/ml peuvent être utilisés. En variante, un échantillon comprenant moins de 10^3 CFU/ml peut être utilisé, par exemple, au moins 10^2 CFU/ml. Un échantillon comprenant moins de 10^2 CFU/ml peut également être utilisé dans les procédés de la présente invention.

Dans un mode de réalisation de la présente invention, les microorganismes peuvent être détectés par ajout d'un marqueur qui marque des microorganismes (à savoir, un marqueur ou un colorant) avant de déterminer le nombre ou la quantité de microorganismes dans un échantillon ou par des procédés qui utilisent une propriété intrinsèque du microorganisme, telle que par exemple le contraste de phase ou n'importe quel autre procédé connu dans l'état de la technique pour quantifier le nombre de bactéries dans l'échantillon. Des marqueurs appropriés peuvent comprendre des colorants colorés ou fluorescents, par exemple le marquage Gram ou d'autres marquages pour un peptidoglycane ou un marquage d'ADN, comme moyen de visualiser le microorganisme. Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, l'ADN à l'intérieur d'un microorganisme peut être marqué à l'aide de Vybrant® DyeCycleTM. D'autres colorants d'ADN sont bien connus et disponibles. En effet, le nombre de colorants disponibles dans l'état de la technique pour marquer des bactéries est vaste et de grands nombres de tels colorants ont été documentés, comprenant dans des textes de référence standard, et sont disponibles dans le commerce,

par exemple auprès de Life Technologies. Le marquage direct de microorganismes par coloration est facile à réaliser, pratique et est peu coûteux, et par conséquent représente un mode de réalisation préféré.

5

Ainsi, par exemple, les microorganismes peuvent être cultivés pour le test AST dans des puits d'une plaque de micro-titration, et à la fin des périodes de croissance le colorant ou marqueur peut être ajouté et les puits de plaque peuvent être imaginés et le nombre ou la quantité de microorganismes peut être évalué, par détermination du nombre et/ou de la taille de cellules microbiennes, agrégats ou colonies, par exemple par comptage ou imagerie. En variante, les microorganismes peuvent être énumérés à l'aide d'un cytomètre de flux ou d'un type similaire d'instrument, par exemple l'instrument Aquila 400 provenant de Q-linea AB (Suède), par exemple tel que décrit dans la demande de brevet américain N°61/979319.

20

Dans un mode de réalisation alternatif, un microorganisme peut être spécifiquement marqué par l'intermédiaire d'une caractéristique biologique à l'intérieur ou sur le microorganisme. Une « caractéristique biologique » peut par exemple être une molécule dans ou sur le microorganisme, par exemple, une protéine ou une autre biomolécule exprimée ou localisée sur la surface cellulaire. Par exemple, un marqueur, par exemple un marqueur coloré ou fluorescent, peut être couplé à une protéine ou à une autre molécule de liaison par affinité qui se lie spécifiquement à une caractéristique biologique particulière. Dans un mode de réalisation, la protéine peut être une lectine, un affibody ou un anticorps, ou un fragment d'anticorps. Les

25

30

microorganismes marqués de cette façon peuvent être détectés, par exemple énumérés tel que décrit précédemment.

5 Dans un autre mode de réalisation, des sondes de proximité peuvent être utilisées pour détecter une caractéristique biologique spécifique à l'intérieur ou sur un microorganisme.

10 Dans un autre mode de réalisation alternatif de la présente invention, les microorganismes peuvent être détectés et énumérés à l'aide de la sonde cadenas et le procédé de détection de molécule unique amplifiée à base de RCA (ASMD) discuté ci-dessus (pour l'utilisation dans les tests moléculaires). De tels procédés permettent à des cellules
15 microbiennes uniques d'être détectées et comptées. Ainsi, le microorganisme peut être détecté par liaison de la sonde cadenas et le nombre de microorganismes dans un échantillon peut être mesuré indirectement par un signal amplifié généré par l'intermédiaire de la RCA de la sonde cadenas circularisée. Chaque produit de RCA (blob) peut être indicateur d'un microorganisme unique. Les microorganismes peuvent être lysés et des sondes cadenas peuvent être utilisées, lesquelles sont conçues pour s'hybrider à une ou plusieurs séquences nucléotidiques des microorganismes. Ceci
20 peut comprendre une étape de séparation de l'ADN tel que discuté ci-dessus, et de préférence de séparation selective, ou d'enrichissement pour, de l'ADN microbien, également tel que discuté ci-dessus. Puisque dans le test AST les cultures sont généralement moins complexes que dans l'étape de culture
25 d'échantillon clinique initiale, un protocole simplifié pour la séparation ou l'enrichissement d'ADN microbien peut être utilisé, mettant en jeu par exemple la filtration pour

séparer les microorganismes et la lyse cellulaire microbienne ou simplement la lyse cellulaire microbienne directe.

En variante, des molécules de liaison par affinité peuvent être utilisées, lesquelles se lient à une ou plusieurs molécules présentes sur un microorganisme ou à l'intérieur d'un microorganisme lysé, telles qu'une sonde d'affinité étant fournie avec un marqueur ou une étiquette d'acide nucléique auquel/à laquelle une sonde cadenas peut s'hybrider, à savoir comparable à une procédure de détection d'immunoRCA. Similairement, des sondes de proximité peuvent être utilisées pour se lier à une cible dans ou sur un microorganisme et les domaines d'acide nucléique des sondes de proximité peuvent être utilisés pour servir de matrice à la ligature d'une sonde cadenas et facultativement également amorcer son amplification par RCA. Les procédures pour ceci sont largement connues et décrites dans la littérature. Tel qu'indiqué ci-dessus, C2CA peut être utilisé pour l'amplification de signal. Le nombre de microorganismes dans un échantillon peut par conséquent être évalué par comptage du nombre de blobs, qui peuvent être marqués, par exemple marqués par fluorescence, tel que décrit ci-dessus, les « blobs » à l'intérieur d'un échantillon. Ceci fournit ainsi un autre moyen pratique d'obtention d'une lecture de susceptibilité phénotypique numérique.

Il est, d'une manière générale, avantageux de réaliser un test AST pour la culture microbienne qui est testée comme étant pure, à savoir, pour qu'il n'y ait qu'un seul microorganisme.

Ainsi, dans un mode de réalisation préféré selon le second aspect de la présente invention, dans l'étape (f), le

test AST est effectué si un microorganisme unique est identifié dans les tests d'acide nucléique de l'étape (e). C'est-à-dire, le test AST de l'étape (f) est effectué si l'échantillon clinique est déterminé comme contenant uniquement un seul microorganisme. Ceci assure qu'uniquement une culture pure peut être utilisée dans le test AST. Ainsi, dans certains modes de réalisation, si au moins deux microorganismes sont identifiés, l'étape AST de l'étape (f) n'est pas effectuée et l'échantillon clinique est cultivé en outre pour permettre d'autres tests d'identification microbienne et de susceptibilité antimicrobienne d'être réalisés pour identifier le microorganisme et déterminer son profil de résistance antimicrobienne. Cependant, ceci n'est pas une caractéristique essentielle, et il est possible d'utiliser des procédés de détection microbienne sur la base de la visualisation ou de l'imagerie pour réaliser des tests AST, par exemple des procédés tels que fournis par Accelerate Diagnostics qui utilisent l'imagerie de bactéries sur une surface et non en solution, ou en effet des procédés dans lesquels les microorganismes marqués sont détectés dans des systèmes fluidiques, par exemple, les systèmes à base de cassette fluidique de microscopie automatisée de Price et al. 2014, J. Microbiol. Met. 98, 50-58 et par Metzger et al., 2014. J. Microbiol. Met. 79, 160-165, discutés ci-dessus. N'importe quels procédés de détection cellule-par-cellule et d'identification peuvent être utilisés pour le test AST d'échantillons qui contiennent plus d'un microorganisme.

De façon pratique, les procédés de la présente invention peuvent être automatisés. Ainsi, n'importe laquelle des étapes (b)(ii) à (f) dans le procédé selon le second aspect de l'invention peut être automatisée, de préférence n'importe laquelle ou toutes les étapes (b)(ii) à (f). De

manière analogue, l'une quelconque ou plusieurs des étapes à la suite de l'étape (b)(i) dans le procédé selon le premier aspect de l'invention (à savoir les étapes (b)(ii), (b)(iii), (c)) et les tests aux fins d'identification d'un microorganisme et/ou de détermination de la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique peut être automatisée, de préférence toutes ces étapes. Diverses étapes spécifiques ou préférées discutées ci-dessus se plient bien à l'automatisation, par exemple, les procédés ASMD à base de sonde cadenas préférés pour le test moléculaire et/ou le test AST et les procédés de comptage microbien/de colonies. Les procédés de culture automatiques ont déjà été développés, comprenant pour les procédés de culture sanguine pour l'identification microbienne et/ou le test AST et peuvent être utilisés ou adaptés pour l'utilisation selon la présente invention. L'automatisation permettrait l'avantage de la vitesse et la facilité de fonctionnement, ainsi que l'aptitude au multiplexage, qui sont importants dans un environnement de laboratoire clinique et en particulier important dans le diagnostic de la septicémie.

Tel que mentionné ci-dessus et expliqué davantage ci-après, un instrument ou dispositif dédié peut être fourni pour réaliser l'une quelconque ou la totalité des étapes des procédés décrits ci-dessus, lequel dispositif peut être conçu pour recevoir le premier récipient de culture contenant l'échantillon clinique pour le test de l'échantillon clinique. Un tel dispositif peut effectuer l'une ou la totalité des étapes (b)(ii) à (f) du procédé du second aspect de l'invention, lequel dispositif peut être conçu pour recevoir le premier récipient de culture contenant la culture d'échantillon clinique pour la culture et le test AST et ID.

En variante, le dispositif peut effectuer l'une quelconque ou la totalité des étapes du procédé selon le premier aspect de l'invention, à savoir l'une quelconque des étapes (b)(ii) à (c) et/ou pour effectuer un ou plusieurs tests sur l'échantillon médical aux fins d'identifier et/ou de déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique. Ainsi, de préférence, le système de traitement d'échantillons cliniques est un dispositif de détection de microorganisme. La présente invention fournit ainsi un système de test d'échantillons cliniques comprenant un appareil portatif tel que décrit ici, et un dispositif de détection de microorganisme.

Un tel dispositif de détection de microorganisme peut comprendre un dispositif d'extraction d'aliquote de test pour retirer une partie du contenu du premier récipient de culture pour l'utilisation comme aliquote de test ; un dispositif de culture pour cultiver l'échantillon médical dans le premier récipient de culture après l'extraction de l'aliquote de test, et facultativement avant l'extraction de l'aliquote de test ; et un dispositif de test d'ADN pour la séparation de l'ADN à partir de l'aliquote de test, et la mise en œuvre de tests d'acide nucléique sur l'ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans le microorganisme.

Dans un mode de réalisation, le système de traitement d'échantillon clinique pour le test supplémentaire de l'échantillon clinique comprend par conséquent :

un dispositif de détection de microorganisme configuré pour recevoir ledit premier récipient de culture et

étant agencé pour la culture de l'échantillon clinique, ledit dispositif comprenant :

facultativement un second récipient de culture contenant un milieu de culture ;

5 facultativement un dispositif de retrait de partie pour retirer une partie du contenu du premier récipient de culture et transférer la partie au second récipient de culture ;

10 le second récipient de culture étant agencé pour recevoir une culture d'échantillon clinique en tant que partie du contenu du premier récipient de culture, et étant agencé pour cultiver la partie ;

le dispositif comprenant en outre :

15 un dispositif d'extraction d'aliquote de test pour retirer une partie du contenu du premier et/ou second récipient de culture pour une utilisation en tant qu'aliquote de test ; et

20 un dispositif de test d'ADN pour séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test et réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme ;

25 et/ou un dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ledit échantillon clinique cultivé et/ou ladite partie cultivée par surveillance de la croissance microbienne par évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance ; le dispositif étant destiné à cultiver l'échantillon clinique et/ou la partie après extraction de l'aliquote de test, et facultativement avant l'extraction de l'aliquote de test.

Ainsi, dans un mode de réalisation, le dispositif de détection de microorganisme comprend le dispositif de test d'ADN tel que décrit ci-dessus. Dans un mode de réalisation alternatif, le dispositif de détection de microorganisme comprend le dispositif de susceptibilité antimicrobienne destiné à réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne. Dans un autre mode de réalisation, le dispositif comprend à la fois le dispositif de test d'ADN et le dispositif de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne tel que décrit ci-dessus.

Dans un mode de réalisation représentatif, le dispositif de test d'ADN est agencé pour réaliser les tests d'acide nucléique à l'aide :

i. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont pris part ou non à une réaction d'amplification.

30

Dans certains modes de réalisation, le dispositif de détection de microorganismes est agencé de telle sorte que : si le microorganisme donné est identifié par le

dispositif de test d'ADN, alors l'échantillon clinique cultivé produit par le récipient de culture par culture après extraction de l'Aliquote de test est transmis à un dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un
5 test de susceptibilité antimicrobienne sur l'échantillon clinique cultivé par surveillance de la croissance microbienne par évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et dans lequel le type et la concentration des agents antimicrobiens utilisés dans le test
10 de susceptibilité antimicrobienne sont déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés par le dispositif de test d'ADN ; et si le microorganisme donné n'est pas identifié par le dispositif de test d'ADN, alors le dispositif de détection de
15 microorganisme cultive de nouveau l'échantillon clinique dans le récipient de culture pour permettre à des tests d'identification microbienne et de susceptibilité antimicrobienne supplémentaires d'être réalisés après une culture additionnelle de façon à identifier le microorganisme
20 et à déterminer son profil de résistance antimicrobienne.

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention concerne un système de test d'échantillon clinique comprenant :

25 un appareil portatif pour le transport et l'incubation d'un échantillon clinique dans un premier récipient de culture, l'appareil comprenant : un conteneur pouvant être scellé ayant un compartiment isolé thermiquement pour recevoir le premier récipient de culture et un
30 dispositif de chauffage pour chauffer l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon ; et

un dispositif de détection de microorganismes configuré pour recevoir ledit premier récipient de culture et étant agencé pour la culture de l'échantillon clinique, ledit dispositif comprenant :

5 facultativement un second récipient de culture contenant un milieu de culture ;

 facultativement un dispositif de retrait de partie pour retirer une partie du contenu du premier récipient de culture et transférer la partie dans le second récipient de 10 culture ;

 le second récipient de culture étant agencé pour recevoir une culture d'échantillon clinique en tant que partie du contenu du premier récipient de culture, et étant agencé pour cultiver la partie ;

15 le dispositif comprenant en outre :

 un dispositif d'extraction d'aliquote de test pour retirer une partie du contenu du premier et/ou second récipient de culture pour l'utilisation en tant qu'aliquote de test ; et

20 un dispositif de test d'ADN pour séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test, et réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance 25 antimicrobienne dans ledit microorganisme, le dispositif de test d'ADN étant agencé pour réaliser les tests d'acide nucléique à l'aide de :

 i. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde 30 ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont pris part ou non à une réaction d'amplification ;

le dispositif de détection de microorganismes étant agencé de telle sorte que : si le microorganisme donné est identifié par le dispositif de test d'ADN, alors l'échantillon clinique cultivé et/ou la partie cultivée produite par le premier et/ou second récipient de culture par culture après extraction de l'aliquote de test est transmis à un dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ledit échantillon clinique cultivé et/ou la partie cultivée par surveillance de la croissance microbienne par évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la concentration d'agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et les marqueurs de résistance antimicrobienne détectés par le dispositif de test d'ADN ; le dispositif étant destiné à cultiver l'échantillon clinique et/ou la partie après extraction de l'aliquote de test, et facultativement avant l'extraction de l'aliquote de test.

Vu à partir d'un aspect supplémentaire, le système comprend un dispositif de détection de microorganismes configuré pour recevoir ledit premier récipient de culture et

étant agencé pour cultiver l'échantillon clinique, ledit dispositif comprenant :

un dispositif d'extraction d'aliquote de test pour retirer une partie du contenu du premier récipient de culture
5 pour l'utilisation en tant qu'aliquote de test ; et

un dispositif de test d'ADN pour séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test, et réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un
10 ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, le dispositif de test d'ADN étant agencé pour réaliser les tests d'acide nucléique à l'aide de :

i. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide
15 nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide
20 nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un
25 marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont pris part ou non à une réaction d'amplification ;

le dispositif de détection de microorganismes étant agencé de telle sorte que : si le microorganisme donné est identifié par le dispositif de test d'ADN, alors l'échantillon clinique cultivé produit par le premier récipient de culture par culture après extraction de

l'Aliquote de test est transmis à un dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ledit échantillon clinique cultivé par surveillance de la croissance microbienne par 5 évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la concentration d'agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne 10 détectés par le dispositif de test d'ADN ;

le dispositif étant destiné à la culture de l'échantillon clinique après l'extraction de l'Aliquote de test, et facultativement avant l'extraction de l'Aliquote de test.

15

Visualisé à partir d'encore un autre aspect, le système comprend un dispositif de détection de microorganisme configuré pour recevoir ledit premier récipient de culture et étant agencé pour cultiver l'échantillon clinique, ledit dispositif comprenant :

un second récipient de culture contenant un milieu de culture ;

25 un dispositif de retrait de partie pour retirer une partie du contenu du premier récipient de culture et transférer la partie au second récipient de culture ;

le second récipient de culture étant agencé pour recevoir un mélange d'échantillon clinique/milieu ou une culture d'échantillon clinique comme partie du contenu du premier récipient de culture, et étant agencé pour cultiver 30 la partie ;

le dispositif comprenant en outre :

un dispositif d'extraction d'aliquote de test pour retirer une partie du contenu du second récipient de culture pour une utilisation comme aliquote de test ; et

5 un dispositif de test d'ADN pour séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test, et réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, le dispositif de test d'ADN étant
10 agencé pour réaliser les tests d'acide nucléique à l'aide de :

i. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou
15 une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est indicatrice d'un microorganisme donné ; et

ii. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

25 et il est détecté si lesdites sondes ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont pris part ou non à une réaction d'amplification ;

le dispositif de détection de microorganismes est agencé de telle sorte que : si le microorganisme donné est identifié par le dispositif de test d'ADN, alors la partie
30 cultivée produite par le second récipient de culture par culture après l'extraction de l'aliquote de test est transmise à un dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un test de susceptibilité

antimicrobienne sur ladite partie cultivée par surveillance de la croissance microbienne par évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la concentration d'agents antimicrobiens utilisés dans ledit 5 test de susceptibilité antimicrobienne sont déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés par le dispositif de test d'ADN ;

le dispositif est destiné à la culture de la partie après extraction de l'aliquote de test, et facultativement 10 avant l'extraction de l'aliquote de test.

Dans certains modes de réalisation, le dispositif de détection de microorganismes peut être configuré pour cultiver en outre ledit échantillon clinique et/ou ladite 15 partie cultivée dans le premier et/ou second récipient de culture si le microorganisme donné n'est pas identifié par le dispositif de test d'ADN, pour permettre à d'autres tests d'identification microbienne et de susceptibilité antimicrobienne d'être réalisés après culture supplémentaire 20 de façon à identifier le microorganisme et déterminer son profil de résistance antimicrobienne.

L'appareil portatif comprend un conteneur pouvant être scellé ayant un compartiment isolé thermiquement pour recevoir le premier récipient de culture et un dispositif de 25 chauffage pour chauffer l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon.

Le dispositif de chauffage peut, de préférence, 30 être destiné à maintenir l'échantillon à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon. Ici, le maintien de la température signifie maintenir la température de l'échantillon dans une plage donnée (à laquelle la

préculture peut toujours avoir lieu) pendant un laps de temps prédéterminé ou jusqu'à ce que le premier récipient de culture soit retiré du conteneur. De préférence, l'échantillon est maintenu à une température qui est dans les 5 degrés de la température optimale, de façon davantage préférée dans les 2 degrés de la température optimale. De façon à maintenir l'échantillon à une température requise après chauffage, le dispositif de chauffage devrait être agencé pour fournir suffisamment de chaleur pour remplacer la chaleur perdue par le compartiment isolé thermiquement au cours de l'utilisation du dispositif pour transporter l'échantillon.

Comme brièvement discuté ci-dessus en référence aux procédés de la présente invention, dans certains modes de réalisation, l'appareil portatif peut comprendre un agitateur pour agiter le premier récipient de culture et/ou l'échantillon dans le récipient pendant le transport. L'agitation pendant le chauffage assure un chauffage homogène de l'échantillon, de même qu'elle favorise la culture efficace de l'échantillon. L'utilisation de l'agitation a été trouvée comme étant bénéfique au fonctionnement de l'appareil de préculture. Dans de tels modes de réalisation, l'appareil proposé peut de ce fait fournir une culture améliorée par comparaison avec les dispositifs sans un dispositif d'agitation intégré. Des agents microbiologiques dans l'échantillon peuvent être maintenus en suspension et l'agitation permet également à l'échantillon d'être aéré. L'agitateur peut faire rouler, incliner, déplacer, secouer, faire tourner ou inverser de façon répétée le récipient de culture. Ainsi, le récipient peut être déplacé par rapport au reste de l'appareil portatif. En variante ou de façon supplémentaire, l'agitateur peut déplacer l'échantillon à

l'intérieur du récipient, ce qui peut être fait sans déplacement du récipient par rapport au reste de l'appareil portatif. Par exemple, le récipient de culture peut comprendre un barreau agitateur magnétique et l'agitateur 5 peut comprendre un moyen pour générer un champ magnétique rotatif (par exemple, un aimant rotatif ou un ensemble d'électro-aimants stationnaires), l'agitateur étant ainsi actionnable pour amener le barreau agitateur magnétique à tourner, permettant ainsi d'agiter l'échantillon. Une 10 alternative supplémentaire est d'utiliser la convection thermique par l'utilisation d'une température différentielle sur les différents côtés du récipient de culture.

Les inventeurs ont fait la constatation non 15 évidente que, pour certains systèmes de diagnostic, tels que celui décrit dans WO2015/189390, la préculture n'est pas problématique. Par exemple, la préculture est acceptable si l'analyse n'est pas dépendante d'une détermination positive de la croissance microbienne, à savoir la détection d'un 20 échantillon positif dans une armoire de culture classique. Si la préculture est acceptable, le conteneur n'a pas besoin d'être refroidi étant donné qu'il n'y a pas besoin d'empêcher (ou de réduire le degré de) la préculture. En outre, les inventeurs ont réalisé qu'il est avantageux de précultiver 25 l'échantillon alors qu'il est en transit vers le laboratoire, puisque ceci permet au test d'échantillon d'être conduit plus rapidement une fois qu'il est reçu au laboratoire réalisant le test. Par conséquent, les inventeurs ont reconnu qu'il est avantageux de chauffer l'échantillon jusqu'au-dessus de la 30 température ambiante tout en agitant facultativement l'échantillon périodiquement ou de manière continue plutôt que de le refroidir ou de le maintenir à température ambiante.

Le compartiment isolé thermiquement est disposé à l'intérieur du conteneur apte à être scellé, autrement dit, est un espace intérieur/volume intérieur dans le conteneur 5 apte à être scellé. Le compartiment isolé thermiquement peut comprendre un manchon pour maintenir le premier récipient de culture. Il est avantageux pour le manchon d'être amovible et de préférence jetable. Un manchon amovible permet une facilité de manipulation du manchon avec le récipient de 10 culture à l'intérieur de celui-ci, ainsi que la possibilité d'insérer et de retirer le récipient de culture avec le manchon à l'extérieur de l'appareil. Un manchon jetable assure que le risque de contamination provenant du contact 15 avec l'extérieur du premier récipient de culture peut être évité. Un nouveau manchon peut être utilisé pour chaque utilisation de l'appareil portatif, l'appareil portatif ne venant jamais en contact direct avec le premier récipient de culture. Dans ce cas, l'agitateur peut agiter le premier récipient de culture par déplacement du manchon.

20

Le manchon peut être disposé pour se déformer de manière élastique au cours de l'insertion et du retrait du premier récipient de culture, et pour maintenir le récipient de culture de façon sûre en raison de la résilience du 25 manchon alors que le récipient de culture est complètement inséré. Par exemple, le manchon peut comprendre des dents élastiques disposées pour serrer un épaulement du récipient de culture lorsque le récipient est inséré, et pour être poussées élastiquement vers l'extérieur et passer autour 30 d'une circonférence du corps principal du récipient de culture lorsque le récipient est inséré ou retiré.

Dans le cas où le premier récipient de culture lui-même se déplace pour permettre l'agitation, avec ou sans manchon, le compartiment et le conteneur doivent être dimensionnés de façon appropriée de façon à permettre le degré requis de mouvement. Le compartiment peut de ce fait être plus grand que le premier récipient de culture de façon à permettre le mouvement du récipient de culture à l'intérieur du compartiment. Le premier récipient de culture peut être reçu à l'intérieur d'un manchon à l'intérieur du compartiment, et le manchon peut être déplacé par l'agitateur (par rapport au compartiment stationnaire) de façon à contrôler le mouvement du premier récipient de culture. Le conteneur peut alors recevoir le compartiment de façon ajustée. En variante, le compartiment peut être dimensionné de façon à recevoir le premier récipient de culture de façon étroitement ajustée, et le conteneur peut être dimensionné de façon à permettre le mouvement du compartiment lui-même à l'intérieur du conteneur.

Le premier récipient de culture peut être amené à tourner et/ou à se balancer autour d'un ou plusieurs axes alors qu'il est à une position généralement horizontale, une position généralement verticale ou n'importe quelle autre orientation. Dans ce contexte, l'horizontale et la verticale font référence à l'orientation de l'axe principal du flacon, à savoir l'axe de rotation pour un flacon en forme de bouteille. Typiquement, l'ouverture du premier récipient de culture sera à la partie supérieure de cet axe lorsque le flacon est maintenu verticalement.

Un agencement possible pour un agitateur est de placer le premier récipient de culture dans une position horizontale à l'intérieur du conteneur, et pour l'agitateur

d'être disposé pour faire rouler le récipient de culture autour de son axe et/ou balancer l'axe dans un mouvement de bascule de façon à agiter la culture. On préfère dans ce cas que l'appareil portatif soit agencé de façon à être transporté horizontalement, et par conséquent l'appareil peut être doté de marquages ou d'instructions indiquant une orientation avec le récipient de culture horizontal durant le transport.

Une autre possibilité est de fournir un mouvement rotationnel décentré (à savoir désaxé) de l'une ou l'autre des extrémités du premier récipient de culture, ou des deux, par exemple la partie supérieure du récipient de culture, la partie inférieure de récipient de culture ou à la fois la partie supérieure et la partie inférieure du récipient de culture. Ceci pourrait être effectué avec le premier récipient de culture généralement horizontal ou généralement vertical, par exemple en combinant une rotation désaxée de roulement horizontal produisant un mouvement de ballotement de va-et-vient du fluide d'échantillon, ou en combinant une rotation verticale et une rotation désaxée produisant un tourbillon et un mouvement de tourbillonnement à l'intérieur du fluide. Des angles entre l'horizontale et la verticale peuvent également être utilisés, par exemple un angle de 45° de l'axe du flacon. Un tel mouvement de rotation désaxée peut être fourni par une came excentrique ou un dispositif de joug/cardan, par exemple. L'axe de symétrie du premier récipient de culture peut être désaligné d'avec l'axe de rotation de la came, et les deux axes sont non parallèles, de telle sorte que le récipient de culture tourne d'une manière désaxée.

Le premier récipient de culture peut être amené à tourner de manière continue ou par intermittence, et facultativement avec des changements dans la direction de la rotation. De cette façon, le degré d'agitation qui est appliqué par l'intermédiaire de la rotation peut être contrôlé.

Un mode de réalisation à titre d'exemple utilise une formation de type plateau oscillant, avec le premier récipient de culture couplé à un dispositif de rotation avec un axe de symétrie du premier récipient de culture hors de l'alignement avec l'axe de rotation du dispositif de rotation. Une façon d'obtenir ceci est de monter le premier récipient de culture avec la base du flacon non perpendiculaire à l'axe de rotation, par exemple en ayant une surface inclinée, une structure d'espaceur, un coin ou n'importe quelle autre structure assurant que la base du récipient de culture ne se trouve pas perpendiculaire à l'axe de rotation du dispositif de rotation. Le montage du premier récipient de culture peut être fait par l'intermédiaire d'un manchon qui maintient le flacon comme expliqué ci-dessus.

Un autre exemple utilise un joug avec le premier récipient de culture suspendu verticalement à une connexion pivotante et le centre de masse du récipient de culture au-dessous du point de pivotement. Ce joug peut être monté pour la rotation et lorsque le joug est mis en rotation, le récipient suspendu oscillera vers l'extérieur, permettant à un mouvement de tourbillonnement d'être appliqué à l'échantillon dans le récipient de culture.

Le dispositif de rotation peut comprendre une roue entraînée en rotation par un moteur, la direction radiale de la roue étant perpendiculaire à l'axe de rotation, qui peut passer à travers le centre de la roue. Un axe décentré pourrait fournir une autre option pour une action

d'agitation. L'appareil peut être agencé de telle sorte que le premier récipient de culture est maintenu sur la roue pour la rotation avec la roue, par exemple au moyen d'une clé appropriée ou une autre interconnexion, comprenant un joug 5 tel que décrit ci-dessus, et de telle sorte que le premier récipient de culture a sa base non parallèle à la direction radiale de la roue durant la rotation. Le mouvement décentré peut être combiné avec un mouvement de roulement tout en ne consommant qu'une faible énergie pour l'agitation.

10 Une autre possibilité est de permettre un mouvement de roulement horizontal du premier récipient de culture, tout en étant positionné horizontalement, pour créer une agitation à l'intérieur de l'échantillon.

15 Comme indiqué ci-dessus, encore une autre possibilité pour un agitateur est d'agiter le contenu du premier récipient de culture (un mélange d'un milieu de culture approprié et de l'échantillon clinique) directement, par exemple sans secouage, inclinaison, balancement ou roulement du premier récipient de culture lui-même. En 20 conséquence, dans certains modes de réalisation, le récipient de culture peut contenir un dispositif d'agitation magnétique, par exemple un barreau agitateur magnétique ou une toupie entraînée magnétiquement), et l'agitateur peut comprendre un moyen pour générer un champ magnétique rotatif 25 (par exemple, un aimant rotatif ou un ensemble d'électroaimants stationnaires), l'agitateur étant alors actionnable pour amener le barreau agitateur magnétique à tourner, permettant ainsi d'agiter l'échantillon. En variante, le récipient de culture peut contenir un arbre 30 agitateur comprenant un arbre central monté le long de l'axe principal du premier récipient de culture comprenant une ou plusieurs pales ou lames agitatriices qui peuvent être montées radialement par rapport à l'arbre central, qui peut être

amené à tourner mécaniquement par l'intermédiaire d'une partie qui s'étend à l'extérieur du récipient de culture, et l'agitateur peut comprendre un moyen pour faire tourner le dispositif d'agitation (par exemple, un moteur configuré pour entraîner le dispositif d'agitation par l'intermédiaire de sa partie externe, par exemple par l'intermédiaire d'un adaptateur).

L'agitateur peut être commandé par un contrôleur. L'agitation peut être enregistrée par un accéléromètre pour mesurer le degré d'agitation du premier récipient de culture durant le transport. Dans ce cas, le contrôleur peut ajuster la durée et/ou le degré d'agitation pour fournir une agitation minimale préfixée de l'échantillon. Le degré d'agitation enregistré par l'accéléromètre peut être affiché sur le dispositif d'affichage sur lequel l'enregistrement par le temporisateur est affiché, ou sur un dispositif d'affichage séparé.

L'agitateur peut agiter l'échantillon de manière constante, ou peut agiter l'échantillon par intermittence, à savoir par cyclage à travers une période d'agitation de façon constante, suivie par une période sans agitation. Les durées de la période d'agitation et de la période de non-agitation peuvent être choisies selon le cas et peuvent être commandées par le contrôleur.

L'agitateur peut être principalement ou entièrement à l'intérieur du compartiment isolé thermiquement. Si l'agitateur, ou au moins les parties mobiles de l'agitateur, est à l'intérieur du compartiment isolé thermiquement, alors le risque de perte de chaleur par des ouvertures à l'intérieur du compartiment isolé thermiquement est rendu minimal. De plus, dans le cas où un moteur électrique est utilisé pour l'agitation, alors le moteur électrique peut être avantageusement à l'intérieur du compartiment isolé

puisque la perte de chaleur à partir du moteur contribuera alors au chauffage du compartiment isolé thermiquement.

Comme noté ci-dessus, l'appareil est approprié pour le transport d'un échantillon clinique dans un premier récipient de culture, et est par conséquent dimensionné de manière appropriée. En outre, l'appareil peut comprendre un récipient de culture (à savoir un premier récipient de culture) tel qu'un flacon de culture de sang tel que décrit ailleurs. Ainsi, dans un mode de réalisation préféré, l'appareil est approprié pour le transport d'un échantillon clinique dans un flacon de culture de sang. Il doit être noté qu'un flacon de culture de sang est une forme reconnue de flacon dans le domaine de l'invention et désigne un flacon qui est spécifiquement conçu pour et est fourni pour la culture d'échantillons cliniques tels que des échantillons de sanguins. Il ne serait, par exemple, pas évident d'utiliser un tel flacon dans un dispositif destiné à des fins autres que la culture d'échantillons cliniques, et ainsi même si un dispositif de l'état antérieur de la technique destiné à conserver une matière biologique (tel que les dispositifs dans GB 2055530 ou US 6028293) était capable de maintenir un flacon de culture de sang, il serait néanmoins non évident d'insérer un flacon de culture de sang à l'intérieur d'un tel dispositif. A la place, l'homme du métier chercherait uniquement des dispositifs de culture de sang lorsqu'il considérerait comment manipuler des flacons de culture de sang. De plus, il n'est pas considéré être évident d'adapter des dispositifs médicaux spécialisés pour d'autres récipients, tels que des tubes de collecte sous vide de US 2013/226032, pour utiliser un flacon de culture de sang.

L'appareil peut, par exemple, être approprié pour le transport d'un flacon de culture de sang Becton Dickinson Bactec™ et peut comprendre un tel flacon. Ceux-ci ont une

hauteur maximale de 147 mm et un diamètre maximal de 39,7 mm. En variante, ou de plus, l'appareil peut être approprié pour le transport d'un flacon de culture de sang Biomerieux BactAlert®. Ceux-ci ont une hauteur maximale de 117 mm et un diamètre maximal de 35 mm. Une autre alternative est que l'appareil puisse être approprié pour le transport d'un flacon de culture de sang Thermo Fisher VersaTrek® et peut comprendre un tel flacon. Le flacon VersaTrek® de 40 ml a une hauteur maximale de 124 mm et un diamètre maximal de 40 mm. Le flacon VersaTrek® de 80 ml a une hauteur maximale de 105 mm et un diamètre maximal de 57 mm.

En variante ou de plus, l'appareil peut être approprié pour le transport de n'importe quel autre flacon de culture de sang, de préférence ayant un volume inférieur à 200 ml, de façon davantage préférée inférieur à 100 ml et, de façon que l'on préfère le plus, inférieur à 50 ml, et ayant des dimensions connues, et l'appareil peut comprendre un tel flacon de culture de sang.

Dans certains exemples, l'appareil comprend un premier récipient de culture et également un échantillon clinique à l'intérieur du premier récipient de culture. L'échantillon clinique est, de préférence, un échantillon tel que décrit ci-dessus fourni dans le récipient dans un état qui nécessite la culture en relation avec le traitement ultérieur de l'échantillon. L'échantillon clinique peut être un échantillon de sang nécessitant la culture pour permettre l'identification de microorganismes dans le sang. L'échantillon clinique peut être un échantillon prélevé à partir d'un patient afin de fournir des informations à propos de l'état médical du patient. L'échantillon peut être un échantillon prélevé à partir d'un patient afin de détecter et caractériser un microorganisme dans l'échantillon, par exemple à l'aide d'un procédé tel que décrit dans

WO2015/189390. L'échantillon peut être fourni dans le flacon dans un état initialement non cultivé, la culture de l'échantillon ayant lieu ensuite au cours du transport de l'échantillon dans le flacon à l'intérieur de l'appareil.

5 L'appareil peut ainsi comprendre un échantillon clinique non cultivé qui nécessite la culture, un échantillon clinique partiellement cultivé, ou un échantillon qui a été cultivé suffisamment pour permettre le traitement ultérieur et/ou le test ultérieur de l'échantillon, par exemple un test de
10 diagnostic tel que celui décrit dans la demande de brevet WO2015/189390. Cependant, comme discuté plus en détail ci-dessus, le test de diagnostic peut réaliser un ou plusieurs tests sur l'échantillon médical afin d'identifier un microorganisme et/ou déterminer la susceptibilité
15 antimicrobienne d'un microorganisme dans l'échantillon clinique, par exemple un test ID et/ou AST, et le test de diagnostic réalisé par le dispositif, ne pas être limité à la réalisation d'un procédé de détection tel que décrit dans la demande de brevet ci-dessus.

20 L'appareil peut avoir des dimensions extérieures lui permettant d'être transporté dans un système de tube pneumatique.

Le compartiment isolé thermiquement est, de préférence, conçu avec des dimensions appropriées pour
25 recevoir le premier récipient de culture. Dans des modes de réalisation particulièrement préférés, l'appareil est destiné à recevoir un flacon de culture de sang, par exemple il peut comprendre un espace cylindrique, qui peut être agencé pour recevoir un flacon ayant un diamètre de 57 mm ou au-dessous
30 et une hauteur de 147 mm ou au-dessous. Cependant, dans certains modes de réalisation, le compartiment peut être plus grand de façon à permettre un déplacement du flacon à l'intérieur du compartiment. On préfère que le compartiment

isolé thermiquement reçoive la totalité ou au moins la majorité du flacon.

Le compartiment isolé thermiquement peut être doublé avec une matière élastique et/ou être doté d'éléments 5 déformables pour maintenir de manière sûre le premier récipient de culture. Ceci peut comprendre un manchon tel que décrit ci-dessus. Avec l'utilisation d'éléments déformables/élastiques, l'intérieur du compartiment peut être plus petit que le récipient de culture lorsqu'aucun récipient 10 de culture n'est présent, puis se déformer pour recevoir le récipient de culture lorsque le récipient de culture est inséré. De façon à permettre à une gamme de récipients de culture de différentes dimensions d'être reçus par une seule conception de l'appareil, l'appareil peut être équipé d'un 15 mécanisme d'ajustement pour ajuster la dimension du compartiment pour s'adapter à des récipients de différentes dimensions. Le mécanisme d'ajustement peut comprendre la matière élastique et/ou les éléments déformables mentionnés ci-dessus. Le mécanisme d'ajustement peut, en variante ou en 20 plus, comprendre un ou plusieurs éléments de glissement (ou des éléments détachables et mobiles) comme parties des parois du compartiment. Par exemple, une ou plusieurs des parois peuvent avoir une fixation Velcro sur les côtés du conteneur apte à être scellé, et le point de fixation peut être 25 déplaçable par détachement du Velcro puis re-fixation de celui-ci dans une position différente.

Le conteneur peut être configuré pour maintenir uniquement un récipient de culture. En variante, l'appareil peut être configuré pour maintenir une pluralité de 30 récipients de culture, par exemple, deux, trois ou quatre récipients de culture. L'appareil peut être configuré pour recevoir les différents récipients de culture à l'intérieur d'un seul compartiment isolé thermiquement (à savoir le

compartiment isolé thermiquement est dimensionné pour recevoir une pluralité de récipients) ou peut comprendre une pluralité de compartiments isolés thermiquement, chacun destiné à recevoir un seul récipient de culture. Si une 5 pluralité de compartiments isolés thermiquement est fournie, chaque compartiment peut être chauffé (et/ou surveillé et contrôlé, comme décrit ci-après) séparément. Il peut être possible de séparer du conteneur le compartiment isolé thermiquement qui maintient le récipient de culture. Le 10 compartiment isolé thermiquement, séparable, peut être un consommable. Les compartiments séparés peuvent être transportés individuellement.

L'appareil peut comprendre un contrôleur pour commander le dispositif de chauffage afin de maintenir une 15 température préréglée. Ceci peut permettre à l'échantillon d'être maintenu à une température précise et fiable. Le contrôleur pour commander le dispositif de chauffage peut être le même que le contrôleur pour commander l'agitateur.

L'appareil peut comprendre un détecteur de 20 température pour surveiller la température dans l'intérieur du compartiment isolé thermiquement. Si à la fois un contrôleur et un détecteur de température sont prévus, le contrôleur peut être en communication avec le détecteur de température de façon à recevoir la sortie de température 25 mesurée provenant du détecteur de température. Le contrôleur peut être actionnable pour ajuster le dispositif de chauffage selon la température mesurée par le détecteur de température, de préférence dans un système de commande de rétroaction.

Le dispositif de chauffage peut comprendre un 30 dispositif de chauffage chimique. Le dispositif de chauffage chimique peut être un dispositif de chauffage jetable à utilisation unique, de telle sorte qu'un nouveau dispositif de chauffage chimique est utilisé à chaque fois qu'un premier

récipient de culture est mis en préculture. Le dispositif de chauffage chimique peut par exemple faire usage de la chaleur libérée par catalyse de rouille de fer ou dissolution du chlorure de calcium. Le dispositif de chauffage peut par 5 exemple faire usage d'une réaction exothermique entre une pluralité de réactifs. En variante, le dispositif de chauffage peut faire usage de réactions exothermiques telles que des matériaux à changement de phase, par exemple de la cristallisation exothermique d'une solution d'acétate de 10 sodium sursaturée par exemple. De tels dispositifs de chauffage peuvent être réutilisables (et peuvent être régénérés pour une réutilisation par mise en place dans de l'eau bouillante, par exemple).

Le dispositif de chauffage peut comprendre un 15 dispositif de chauffage électrique tel qu'un dispositif de chauffage à résistance, par exemple un enroulement de fil métallique, ou un dispositif de chauffage kapton, chacun de préférence alimenté par une batterie. La sortie du dispositif de chauffage électrique peut être commandée par le 20 contrôleur, qui, comme mentionné ci-dessus, peut commander le dispositif de chauffage en réponse aux mesures de température provenant d'un détecteur de température. Ceci peut permettre à la température d'être plus précisément contrôlée. Le dispositif de chauffage peut comprendre une combinaison de 25 différents dispositifs de chauffage. Par exemple, un dispositif de chauffage chimique peut être utilisé pour éléver la température de l'échantillon rapidement de la température ambiante à la température désirée, puis un dispositif de chauffage à résistance peut être utilisé pour 30 contrôler plus précisément la température une fois que l'échantillon est proche de la température optimale, avec une faible consommation d'énergie.

Le dispositif de chauffage peut être flexible et/ou formé en une courbe telle qu'une forme tubulaire partielle ou totale, de telle sorte qu'il peut être enveloppé ou placé autour d'au moins une partie du premier récipient de culture.

5 Le dispositif de chauffage peut être activé automatiquement, par exemple en chargeant l'échantillon dans le conteneur ou en fermant le couvercle du conteneur. En variante, le dispositif de chauffage peut être mis en marche manuellement par l'utilisateur. Le dispositif de chauffage 10 peut être actionnable pour chauffer et de préférence maintenir l'échantillon à une température de 25°C ou plus, et de façon davantage préférée à une température de 30°C ou plus.

15 Le dispositif de chauffage peut être actionnable pour chauffer et de préférence maintenir l'échantillon à une température de 45°C ou au-dessous, de façon davantage préférée à une température de 40°C ou au-dessous et, de la façon que l'on préfère le plus, à une température de 37°C ou au-dessous. Le dispositif de chauffage peut être actionnable 20 pour chauffer et de préférence maintenir l'échantillon à une température de 25°C à 40°C, de façon davantage préférée de 30°C à 37°C, et, de la façon que l'on préfère le plus, à 35°C.

25 Le dispositif de chauffage peut être actionnable pour chauffer et de préférence maintenir l'échantillon à l'intérieur des plages de température mentionnées ci-dessus pendant une période allant jusqu'à 12 heures, 6 heures, 4 heures, 3 heures ou 1 heure.

Il y a naturellement une interaction entre la 30 performance de dispositif de chauffage requise, l'isolation thermique de l'appareil, et la température extérieure/ambiante. Le dispositif de chauffage peut être agencé pour fournir les caractéristiques ci-dessus pour des

températures ambiantes de 15°C et au-dessus, de préférence 10°C et au-dessus et, de façon davantage préférée, de 0°C et au-dessus. Un fonctionnement à température inférieure sera typiquement non requis, mais pourrait être conçu en cas de
5 besoin.

Dans des modes de réalisation à titre d'exemples, l'appareil comprend une source d'alimentation telle qu'une batterie. La batterie peut être utilisée pour alimenter un dispositif de chauffage électrique tel que discuté ci-dessus,
10 ainsi que pour apporter de l'énergie à un contrôleur de l'appareil. La batterie peut être accessible par l'intermédiaire d'un couvercle ou panneau amovible de façon à permettre le remplacement de la batterie. Dans des modes de réalisation préférés, la batterie est rechargeable,
15 permettant ainsi un usage répété du dispositif sans avoir besoin de remplacer la batterie. L'appareil portatif peut être agencé pour recevoir de l'énergie pour recharger la batterie à partir d'un point de charge et l'invention s'étend à une combinaison d'un ou plusieurs appareils portatifs tels
20 que discutés ici avec un point de charge pour recharger la batterie de l'appareil portatif. L'appareil portatif peut recevoir de l'énergie par l'intermédiaire d'une connexion filaire, telle qu'un arrangement de prise mâle et de prise femelle, de préférence avec la prise femelle sur l'appareil
25 portatif et la prise mâle sur un fil connecté au point de charge. En variante ou de plus, le point de charge peut être agencé pour une transmission d'énergie sans fil à l'appareil portatif, par exemple par l'intermédiaire d'un transfert d'énergie inductif. Le point de charge peut être agencé pour
30 une connexion à l'électricité du réseau.

L'appareil portatif peut être agencé pour être actionnable pour chauffer et facultativement agiter le premier récipient de culture alors qu'il est chargé. De cette

façon, le point de charge pourrait être utilisé pour le stockage de l'appareil portatif alors qu'il est en train d'attendre l'échantillon à traiter par la suite, et le chauffage et/ou l'agitation de l'échantillon peuvent être 5 effectués durant ce stockage sans risque d'épuiser le niveau d'énergie de l'appareil portatif.

En général, une institution médicale utiliserait de multiples appareils portatifs simultanément pour permettre la manipulation de nombreux échantillons à la fois, peut-être 10 des dizaines ou même des centaines d'échantillons. Le point de charge peut être agencé pour charger de multiples dispositifs portatifs à la fois, par exemple plus de 10 ou plus de 50 dispositifs. Le point de charge pourrait par conséquent être doté de multiples plaques de charge par 15 induction et/ou de multiples fils permettant la connexion à de nombreux dispositifs portatifs.

L'isolation thermique du compartiment isolé thermiquement peut être conçue pour fonctionner dans les mêmes températures et pour fournir un degré d'isolation 20 approprié pour maintenir la température requise avec un chauffage donné. L'isolation thermique peut comprendre une couche d'un ou plusieurs parmi un aérogel de silice, du polyuréthane expansé, du polystyrène expansé, de la mousse d'urée ou similaires, dans une épaisseur suffisante pour 25 donner les capacités thermiques requises, par exemple, au moins 1 cm, au moins 2 cm, ou au moins 3 cm, au moins 4 cm ou plus, selon le dispositif de chauffage sélectionné et la température requise et la période de temps requise pour la préculture. De multiples couches d'isolation peuvent être 30 incluses si nécessaire. L'isolation thermique peut complètement entourer le compartiment isolé thermiquement et par conséquent peut également être inclus dans un couvercle

ou autre ouverture amovible du compartiment isolé thermiquement.

L'appareil peut comprendre un temporisateur pour enregistrer la durée pendant laquelle l'échantillon a été pré-cultivé. Le temporisateur peut être réglé automatiquement par charge de l'échantillon dans le conteneur, ou peut être lancé manuellement par l'utilisateur. De préférence, le temporisateur est lancé automatiquement lorsque le dispositif de chauffage est mis en marche. Le temporisateur peut également être en communication avec le contrôleur, et le contrôleur peut lancer le temporisateur au même moment que le contrôleur active le dispositif de chauffage. La communication entre le temporisateur et le contrôleur peut se faire par l'intermédiaire de RFID ou de n'importe quel autre moyen.

Lorsqu'un temporisateur est fourni, l'appareil comprend de préférence également un dispositif d'affichage pour montrer le temps enregistré par le temporisateur. Par conséquent, lorsque l'échantillon arrive au laboratoire, le laps de temps pendant lequel l'échantillon a été pré-cultivé peut facilement être évalué.

Dans chacun des trois aspects mentionnés ci-dessus, le dispositif de détection de microorganisme peut être agencé pour réaliser n'importe laquelle ou toutes les étapes du procédé et des étapes préférées/facultatives indiquées ci-dessus. Ainsi, le dispositif du test de l'ADN peut être agencé pour réaliser n'importe laquelle ou toutes les étapes de test de l'ADN décrites ci-dessus, et le dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne peut être agencé pour réaliser n'importe laquelle ou toutes les étapes de test de susceptibilité antimicrobienne décrites ci-dessus.

L'appareil peut comprendre un moyen pour déterminer la quantité de matière cellulaire microbienne (c'est-à-dire

la biomasse microbienne) présente dans un échantillon, en particulier par évaluation ou détermination de celle-ci directement. Ceci peut être réalisé par détermination de la quantité de biomasse microbienne visuellement, et en 5 particulier par imagerie. Par conséquent, l'appareil peut comprendre un moyen d'imagerie (par exemple un microscope et facultativement une caméra) pour obtenir des images 2D. L'appareil peut comprendre un processeur pour traiter les 10 images pour déterminer la quantité de matière cellulaire microbienne. Le processeur peut être configuré pour déterminer l'aire de biomasse microbienne (plus particulièrement l'aire de biomasse microbienne dans le champ de vision soumis à l'étude, par exemple dans une image).

Plus généralement, le moyen d'imagerie et le 15 processeur peuvent être configurés pour déterminer la quantité et/ou le nombre et/ou la dimension de microorganismes et/ou de colonies microbiennes ou d'agrégats microbiens. Ceci peut comprendre le comptage de cellules ou de colonies, mais n'est pas limité à de tels procédés et 20 comprend n'importe quel moyen d'évaluation visuelle de la quantité de croissance microbienne par estimation (ou détermination) de la dimension, de l'aire, de la forme, de la morphologie et/ou du nombre de cellules microbiennes, colonies microbiennes ou agrégats microbiens (le terme 25 « agrégat » comprend n'importe quelle collection de cellules à proximité physique, par exemple un amas ou un cluster ; ceci peut comprendre des amas/clusters non clonaux de cellules qui se sont agrégées ou se sont collées les unes aux autres (par exemple des cellules avoisinantes qui se sont agrégées) ainsi que des colonies clonales). Le paramètre utilisé pour mesurer la croissance microbienne peut, mais n'a 30 pas besoin de, varier selon l'identité du microbe (déterminée dans l'étape (e)) et les agents antimicrobiens utilisés dans

l'étape (f). En effet, selon l'organisme et les agents antimicrobiens utilisés, la morphologie ou le motif de croissance des cellules peut être affecté, et ceci peut être altéré ou modifié à partir de la morphologie ou du motif de croissance « normal » ou « typique », par exemple en l'absence de l'agent antimicrobien. Alors que certains procédés de surveillance de croissance AST peuvent dépendre de la détection de tels changements, il n'est pas essentiel selon la présente invention de prendre en compte de tels changements et la quantité (par exemple l'aire) de croissance microbienne ou de biomasse peut être déterminée indépendamment de la morphologie et/ou du motif de croissance. Ainsi, le même procédé de surveillance de croissance peut être utilisé indépendamment de la cellule microbienne et/ou des agents antimicrobiens utilisés.

Le premier récipient de culture contenant l'échantillon clinique précultivé est inséré dans le dispositif de détection de microorganisme, et le dispositif de détection de microorganisme est configuré pour recevoir ou accepter le premier récipient de culture.

Du milieu de culture peut être ajouté au second récipient de culture avant le fonctionnement du dispositif, ou le second récipient de culture peut être rempli avec du milieu de culture lorsqu'il est fourni. Typiquement, le second récipient de culture sera un article consommable.

La culture supplémentaire de l'échantillon clinique ou de la partie dans le premier et/ou second récipient de culture peut avoir lieu dans la même pièce d'appareil que les étapes de test antérieures, ou en variante, le premier et/ou second récipient de culture peut être transféré dans un appareil séparé, le dispositif de détection de microorganisme par conséquent comprenant de multiples parties séparées. Dans le dernier cas, le premier et/ou second récipient de culture

peut être manipulé d'une façon telle, durant l'extraction,
qu'il peut être cultivé durant la nouvelle étape de culture
dans un autre appareil dédié, qui peut avantageusement être
un appareil qui est déjà en place dans l'installation en
5 question, laquelle peut par exemple être un hôpital. Ainsi,
le premier et/ou second récipient de culture est rendu
disponible pour une culture continuée et ceci peut être à
l'intérieur du même appareil que les étapes précédentes, ou
hors de cet appareil et dans une autre partie séparée du
10 dispositif.

Des modes de réalisation préférés de la présente
invention vont maintenant décrits par référence aux figures
annexées, dans lesquelles :

15 la Figure 1 illustre dans (A) un panel de
microréseaux d'échantillon pour la détection de
microorganismes dans un échantillon, et dans (B) l'intensité
de fluorescence du signal généré pour une gamme de
microorganismes. Dans la Figure 1A, les points aux quatre
20 coins et dans le milieu du côté gauche de l'image sont des
points de référence utilisés pour l'alignement d'image. Les
trois points plus clairs indiquent que des séquences
nucléotidiques spécifiques pour *E. coli* sont détectées dans
l'échantillon à l'aide du procédé de détection de la présente
25 invention. La Figure 1B montre le signal généré pour une
gamme de différents microorganismes lorsque des sondes
spécifiques pour *E. coli* sont utilisées.

30 La Figure 2 montre la croissance relative des
bactéries mises en croissance dans un bouillon de MH
supplémenté par de la ciprofloxacine à une plage de
différentes concentrations, par rapport à un échantillon
témoin positif mis en croissance en l'absence de

ciprofloxacine. Les cellules ont été colorées par le colorant Vybrant® DyeCycleTM Orange et comptées par microscopie automatisée.

5 La Figure 3 montre la croissance relative de bactéries mises en croissance dans un bouillon MH supplémenté par un nombre de différents antibiotiques, chacun à une plage de différentes concentrations, par rapport aux échantillons témoins positifs mis en croissance en l'absence de n'importe
10 quel antibiotiques (A - Céfotaxime, B - Ciprofloxacine, C - Gentamicine, D - Meropénème, E - Ceftazidime, F - Pipéracilline + Tazobactam). Les cellules ont été colorées par le colorant Vybrant® DyeCycleTM Orange et comptées par Aquila 400. Ces données indiquent qu'une croissance
15 différentielle peut être détectée dans les 4 heures. Les valeurs de CMI ont été calculées pour chacun des antibiotiques à 4, 6 et 24 heures, et à une plage de valeurs de seuil de coupure.

20 La Figure 4 illustre dans (A) le flux de travail requis pour la détection de molécule unique amplifiée (ASMD) de bactéries à l'intérieur d'un échantillon pour déterminer la susceptibilité à un antibiotique d'un microorganisme, et dans (B) présente la croissance différentielle de bactéries
25 mises en croissance dans un bouillon MH supplémenté par la Ciprofloxacine ou la Céfotaxime, par rapport à un échantillon témoin positif mis en croissance en l'absence de l'un ou l'autre des antibiotiques. Dans la Figure 4B, les produits de RCA indiquant la présence de séquences d'ADN microbiennes
30 spécifiques sont détectés par ASMD, et comptés par Aquila 400.

La Figure 5 illustre un schéma pour détecter des séquences d'ADN microbiennes spécifiques destinées à l'utilisation dans la conception de sonde. Un oligonucléotide de capture biotinylé complémentaire à une région d'ADN microbien se lie à un fragment d'ADN cible et l'immobilise sur une phase solide. Une sonde cadenas, comprenant deux parties complémentaires de cible (les bras 5'/3') et un squelette avec des sites pour la détection (DO -générique), de digestion de restriction et d'amorçage (RO - générique), et d'hybridation d'oligo réseau (AO - unique) se lie à sa cible par l'intermédiaire de ses séquences d'extrémité 5' et 3' complémentaires, et peut être ligaturée en un cercle avant l'amplification par RCA et la réaction C2CA.

La Figure 6 montre un appareil portatif pour le transport d'un échantillon clinique dans un récipient de culture.

La Figure 7 montre un schéma d'un contrôleur, d'un détecteur de température, d'un dispositif de chauffage, d'un agitateur, d'un accéléromètre, d'un temporisateur et d'un dispositif d'affichage pour l'utilisation dans un appareil portatif tel que représenté dans les Figures.

Les Figures 8a et 8b montrent des détails supplémentaires d'une partie d'un autre appareil portatif pour le transport d'un échantillon clinique dans un récipient de culture.

La Figure 9 montre une coupe transversale d'un autre appareil portatif montrant les détails d'un mécanisme d'agitation possible.

La Figure 10 est un diagramme à boîte et moustaches montrant des temps typiques pour le transport d'échantillons d'un patient à un système de diagnostic.

5 Les Figures 11a-11c montrent la croissance de bactéries à la température ambiante (points de données triangulaires) par comparaison avec à 35°C (points de données circulaires) pour (a) *E. coli*, (b) *S aureus* et (c) *C. albicans*.

10

Le conteneur 1 représenté dans la Figure 6 est un appareil portatif configuré pour contenir un seul récipient de culture 2. Le conteneur 1 par conséquent comprend un compartiment 3 isolé thermiquement unique, dimensionné pour recevoir de façon étroitement ajustée un seul récipient de culture. A l'intérieur du compartiment 3 isolé thermiquement est placé un dispositif de chauffage chimique 4 flexible qui s'enroule autour du récipient de culture à l'intérieur du compartiment 3 isolé thermiquement. Le dispositif de chauffage chimique est activé manuellement soit peu de temps avant, soit peu de temps après, le placement du récipient de culture 2 à l'intérieur du compartiment 3 isolé thermiquement. L'appareil est en outre doté d'un agitateur, qui n'est pas représenté dans la Figure 1. L'agitateur pourrait avoir un agencement similaire à celui décrit ci-après en relation avec la Figure 4, par exemple. L'agitateur pourrait être à l'intérieur du conteneur 1 pour déplacer le récipient 2 à l'intérieur du conteneur 1. Ou il pourrait être ajusté à l'extérieur du conteneur 1 pour déplacer le conteneur entier et par là également déplacer le récipient 2 avec le conteneur 1.

Le conteneur 1 est scellé par un couvercle 5 qui peut comprendre un joint d'étanchéité torique 19 (tel que représenté dans la Figure 9).

L'extérieur du conteneur peut comprendre une étiquette (non représentée) sur laquelle peut être écrit le moment auquel l'échantillon a commencé la préculture (à savoir le temps auquel le dispositif de chauffage a été activé).

Le conteneur représenté dans la Figure 6 a une structure simple, qui a l'avantage que le conteneur est robuste et peu coûteux à fabriquer. Par ailleurs, il peut être difficile de maintenir d'une manière précise le récipient de culture à une température fixe pendant une longue période de temps à l'aide de cette disposition.

Pour s'attaquer à ceci, à la place du dispositif de chauffage chimique de la Figure 6, un dispositif de chauffage électrique commandable tel qu'un dispositif de chauffage à résistance 11 (tel que représenté dans la Figure 7) peut être utilisé. Un tel dispositif de chauffage 11 peut être utilisé dans le conteneur 1 de la Figure 6 avec des modifications appropriées au conteneur 1. Il peut également être utilisé dans un conteneur 1 tel que représenté dans les Figures 8a-9, comme discuté plus en détail ci-après. Le dispositif de chauffage à résistance 11 est en communication avec un contrôleur 12, lequel commande la sortie du dispositif de chauffage en réponse aux informations provenant d'un détecteur de température 13, lequel mesure la température à l'intérieur du compartiment 3 isolé thermiquement.

Le contrôleur peut également lancer un temporisateur 14 lorsque le dispositif de chauffage est activé. Le temps enregistré sur le temporisateur peut être affiché sur un dispositif d'affichage LCD 15 monté sur une

surface externe du conteneur 1. Le contrôleur peut également être actionnable pour commander un agitateur 16. L'agitateur 16 secoue le récipient de culture de manière continue de façon à aérer l'échantillon. L'agitateur 16 est 5 commandé par le contrôleur. L'agitation peut être enregistrée par un accéléromètre 20 pour mesurer le degré d'agitation durant le transport. Le degré d'agitation enregistré par le temporisateur d'accéléromètre est affiché sur le dispositif d'affichage LCD 15. Chacun parmi le dispositif de chauffage à 10 résistance 11, le contrôleur 12, le détecteur de température 13, le temporisateur 14, le dispositif d'affichage LCD 15, l'agitateur 16 et l'accéléromètre 20 peut être alimenté par une unité d'alimentation (PSU) 17 (non représentée sur la Figure 7, mais représentée sur la Figure 15 9). La PSU peut, par exemple, être un pack de batteries, qui peut être rechargeable, et/ou facilement remplaçable.

Les Figures 8a et 8b montrent des détails de la base d'un appareil portatif comprenant la partie inférieure d'un compartiment 3 isolé thermiquement. Comme représenté 20 dans la Figure 8a, le compartiment peut avoir une structure à double paroi comprenant une coque interne en aluminium 3a, à laquelle est lié un dispositif de chauffage à résistance kapton 11, et une coque externe en matière plastique 3b. Le compartiment 3 peut être scellé par un couvercle (non représenté) fixé au corps principal du compartiment par une connexion à verrou tournant 6. Le couvercle pourrait être similaire à celui représenté dans la Figure 9. La coque externe en matière plastique 3b peut comprendre deux trous diamétralement opposés 7 qui reçoivent des broches 25 correspondantes disposées dans le conteneur (non représentées). Les broches et les trous 7 réalisent la double fonction de fournir une connexion électrique jusqu'au dispositif de chauffage à résistance kapton 11, et

fournissent également un axe de pivotement autour duquel le compartiment 3 peut être mis en rotation de façon à agiter l'échantillon dans le récipient de culture 2. De cette façon, le compartiment 3 isolé thermiquement peut être déplacé à 5 l'aide de moyens mécaniques pour agiter ainsi mécaniquement le contenu du récipient de culture 2 à l'intérieur du compartiment 3. En variante, l'appareil des Figures 8a et 8b pourrait être adapté de façon à inclure un agitateur interne 16 tel que décrit avec référence à la Figure 9.

10 La Figure 9 montre une coupe transversale d'un autre exemple d'un conteneur 1 montrant les détails d'un mécanisme d'agitation possible. A nouveau, le conteneur est un appareil portatif avec un compartiment 3 isolé thermiquement destiné à maintenir un récipient de culture 2. 15 Le conteneur 1 de la Figure 6 peut comprendre un dispositif de chauffage à résistance 11 tel que représenté dans la Figure 8a. Le dispositif de chauffage 11 conjointement avec l'agitateur 16 peut être contrôlé comme décrit ci-dessus avec référence à la Figure 7.

20 L'agitateur 16 comprend un moteur 16a, une roue tournante 16b, un manchon 16c qui reçoit le récipient de culture 2, un engagement de couplage décentré 16d entre le manchon 16c et la roue tournante 16b, et une bague de verrouillage 16e qui fixe le manchon 16c au compartiment 3 25 approximativement à mi-chemin le long de la longueur du récipient de culture 2. Alors que le moteur 16a tourne, la roue tournante 16b est également entraînée en rotation, et fait tourner de manière correspondante le récipient de culture 2 par l'intermédiaire de la connexion de l'engagement de couplage 16d au manchon 16c qui maintient le récipient de culture 2. La connexion du manchon 16c à la roue tournante 16b est telle que l'axe de symétrie du récipient de culture 2 est désaligné d'avec l'axe de rotation du 30

moteur 16a et la roue à came 16b, et les deux axes sont non parallèles, de telle sorte que le récipient de culture 2 tourne d'une manière désaxée, fixé en place à la bague de verrouillage 16e. Dans cet exemple, ce désalignement axial 5 est réalisé par l'utilisation d'un agencement de couplage 16d ayant une clé qui ne peut pas être complètement ajustée à l'intérieur du renforcement correspondant, de telle sorte que la clé force la base du manchon 16c d'un côté d'être espacé de la surface de la roue tournante 16b, alors que la base du 10 flacon peut être plus proche, voire toucher la roue tournante 16b de l'autre côté. Ceci signifie que la base du manchon 16c, et par conséquent la base du récipient 2, n'est pas parallèle à la direction radiale de la roue 16b et par conséquent l'axe de symétrie de rotation du récipient 2 n'est 15 pas parallèle à l'axe de rotation de la roue 16b.

L'agitateur 16 agite ainsi le récipient de culture 2 par déplacement du manchon 16c lorsque le moteur 16c fait tourner la roue 16b. Le manchon 16c s'ajuste étroitement au récipient de culture 2, qui est un récipient 20 2 d'une dimension standardisée et par conséquent de dimensions connues. Le manchon 16c a des parties de dent flexibles à son extrémité ouverte qui sont disposées pour se déformer de façon élastique au cours de l'insertion et du retrait du récipient de culture 2. Comme présenté dans la Figure 9, ces 25 dents maintiennent le récipient 2 de manière sûre en agrippant l'épaulement du récipient 2 une fois qu'il est complètement inséré dans le manchon 16c.

Le moteur 16a est alimenté par un pack de batteries 17, qui est accessible (pour le remplacement ou la 30 recharge) par un couvercle de fond 18. L'agitateur 16 est commandé par un contrôleur 12, qui est dans cet exemple un PCB. Le moteur 16a est avantageusement contenu à l'intérieur du volume isolé thermiquement du compartiment 3 isolé

thermiquement de telle sorte que la chaleur perdue à partir du moteur 16a peut contribuer au chauffage de l'échantillon clinique dans le récipient de culture 2.

Le compartiment 3 isolé thermiquement comprend un matériau isolé thermiquement (non représenté dans toutes les Figures) autour du conteneur et ayant une épaisseur suffisante pour permettre au dispositif de chauffage de maintenir la température requise. On peut faire varier la nature de l'isolation thermique, à la condition qu'elle fournisse la réduction nécessaire en perte de chaleur. De l'aérogel de silice, du polyuréthane expansé, du polystyrène expansé ou de la mousse d'urée peuvent être utilisés, par exemple.

Facultativement, l'appareil portatif peut comprendre un détecteur pour déterminer si l'échantillon est positif, ainsi qu'un indicateur pour montrer si l'échantillon est positif ou non. L'indicateur peut être une lumière ou n'importe quelle autre forme d'affichage, tel qu'un affichage LCD. Une possibilité est d'utiliser un détecteur optique tel qu'un photodétecteur (tel qu'utilisé, par exemple, dans EP 2828398) pour identifier des modifications du trouble de l'échantillon. Le détecteur optique peut être monté à l'intérieur du manchon autour du récipient de culture dans l'exemple de la Figure 4 de façon à assurer une lecture précise et pouvant être répétée du trouble de l'échantillon même lorsque l'échantillon est agité. Une autre possibilité est l'utilisation d'un détecteur de pH situé à l'intérieur du récipient de culture. Celui-ci pourrait être couplé au contrôleur par une connexion filaire ou sans fil pour communiquer l'énergie et/ou des données de façon à permettre à un indicateur sur l'appareil d'afficher des informations se rapportant au pH à l'intérieur du flacon.

Les procédés et dispositifs proposés décrits ici permettent la préculture d'un échantillon clinique alors qu'il est en cours de transport. Ceci fournit des avantages clairs en relation avec la durée totale pour le traitement 5 d'un échantillon. La Figure 10 est un diagramme à boîte et moustaches présentant les durées typiques pour le transport d'échantillons à partir d'un patient vers un système de diagnostic. Dans les systèmes de l'état antérieur de la technique sans préculture, lorsque l'échantillon est 10 essentiellement inerte durant le transport, ce temps est perdu. Bien que d'autres dispositifs pour la préculture aient été proposés à certaines fins, par exemple tel que dans US 2013/226032, de tels dispositifs ne fournissent pas 15 l'agitation requise pour la meilleure performance de l'étape de préculture.

Dans des diagnostics médicaux, la durée jusqu'au résultat est souvent communiquée comme la durée à partir du moment où un échantillon est inséré dans un système au moment 20 où le résultat du laboratoire est obtenu. Pour le patient, le problème clé est bien sûr le temps pour répondre à partir du moment où l'échantillon clinique est prélevé à partir du patient au moment où un résultat du laboratoire est obtenu, communiqué à un médecin traitant et une action est prise. Les 25 procédés et dispositifs proposés fournissent un moyen de réduire « le temps jusqu'à l'action » pour un système de diagnostic in vitro en microbiologie, mesuré à partir du moment où l'échantillon clinique est prélevé jusqu'au moment où l'action peut être prise pour traiter le patient.

30

Par exemple, pour des patients ayant une septicémie suspectée alors des cultures sanguines devraient toujours être prélevées. Dans l'art antérieur de la technique, celles-

ci sont transportées au laboratoire de microbiologie, soit à l'hôpital où le patient est admis soit au laboratoire le plus proche ayant des équipements de microbiologie. La durée jusqu'au traitement correctif est très importante et il a été 5 montré que la mortalité augmente de 7 % par heure si aucun traitement adéquat n'est administré. L'identification de l'organisme responsable par culture sanguine permet à des antibiotiques plus focalisés d'être utilisés, réduisant les complications et le risque d'émergence d'une résistance à un 10 antibiotique. Chaque heure de retard dans l'administration d'antibiotique augmente le risque de mort - le retard conduit également à des séjours hospitaliers plus longs et par conséquent à un coût plus important.

15 Les points de la Figure 10 présentent les résultats d'analyse du temps du transport d'un échantillon de patient au laboratoire. Ceci révèle un temps de transport étonnamment long, en moyenne supérieur à 12 heures. L'aptitude à fournir une culture efficace durant le transport diminue de façon 20 drastique la durée jusqu'à un résultat fonctionnel. Le diagramme à boîte et moustaches de 500 échantillons collectés dans un hôpital de dimension moyenne - grande dimension en Europe. Dans le diagramme à boîte et moustaches, 50 % des échantillons tombent dans la boîte, la médiane est présentée 25 dans la boîte et les moustaches présentent des valeurs minimales et maximales dans chaque catégorie.

A partir de ces données, il est évident que l'apport de culture durant le transport est largement 30 bénéfique à la fois pour les échantillons transportés à l'intérieur d'un hôpital ainsi qu'entre des hôpitaux (plateforme) pour des systèmes qui nécessitent normalement la préculture. Des exemples de tels systèmes sont tels que

décris dans WO2015/189390, ainsi que d'autres systèmes reposant actuellement sur des flacons de culture sanguine soi-disant positifs et tels que par exemple Nanosphere Verigen, (Nanosphere Inc.), Biofire BCID (Biomerieux) et 5 AST/ID provenant de Accelerate Diagnostics, tel que décrit dans par exemple US20150225762. Les procédés et dispositifs proposés raccourciront également la durée jusqu'à la soi-disant positivité également dans les soi-disantes armoires de culture sanguine, tels que par exemple Biomerieux BacTec, 10 Becton Dickinson BactAlert et Thermo Fisher VersaTrek (et similaires), tant que la croissance bactérienne est détectée à l'aide d'une mesure absolue et pas une croissance delta après insertion dans le système. En moyenne, une réduction de 5 heures du temps jusqu'à la réponse peut être obtenue à 15 l'intérieur d'un hôpital et une réduction de 16 heures du temps jusqu'à la réponse est possible si les échantillons sont expédiés entre des hôpitaux pour des systèmes reposant sur des flacons de culture sanguine positifs.

20 Un aspect important pour une solution pour contribuer à un temps jusqu'à l'action plus rapide est de rationaliser le flux de travail. Par conséquent, le dépôt des flacons de culture sanguine échantillonnés provenant du patient au site de transport de routine vers le laboratoire 25 de microbiologie est essentiel. Pour assurer la préculture, l'incubateur doit ensuite être transportable et devrait être capable à la fois de chauffer et d'agiter l'échantillon clinique durant le transport.

30 Tel que présenté dans les exemples des Figures 11a à 11c, il est claire que le transport à la température ambiante est considérablement moins efficace pour la stimulation de la croissance de pathogène que le transport à

une température élevée. Trois échantillons avec différentes bactéries ont été divisés et laissés croître dans des milieux de croissance soit à température ambiante soit à 35°C pour simuler le transport aux différentes conditions. Chaque heure 5 la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon a été mesurée à l'aide de l'Ocelloscope (Philips, Pays-Bas) et la Biomasse a été déterminée sur la base d'images acquises à partir de l'Ocelloscope. Pour l'*E.coli*, 1E4 CFU/ml ont été utilisés comme échantillon initial, pour *S. aureus* 10 2,7E3 CFU/ml et pour *C. Albicans* 3,6E2 CFU/ml, tel que déterminé par comptage viable sur des plaques d'agar non sélectives. *E.coli* est gram négative, *S.aureus* est une bactérie gram positive et *C.albicans* est un champignon. Les Figures 6a-6c présentent la croissance de bactéries à la 15 température ambiante (points de données triangulaires) par comparaison à la croissance de bactéries à 35°C (points de données circulaires) pour (a) *E. coli*, (b) *S aureus* et (c) *C.albicans*. Il y a de clairs avantages en termes de préculture dans le contexte du test de diagnostic où la 20 préculture est nécessaire.

EXEMPLES

Exemple 1 - Culture sanguine et identification et 25 caractérisation microbienne par des tests moléculaires.

Du sang dopé par 500 µl de suspension bactérienne d'*E. coli* pour donner une concentration de 10³ CFU/ml a été ajouté à un flacon de culture sanguine Bact/ALERT FA plus 30 (Biomerieux) avec une aiguille à travers les septums. Pour la préculture, nous avons utilisé un Multirotator proprement conçu provenant de Grant Instruments (Grant-bio PTR-35) reconçu pour des agitateurs de flacon de culture sanguine

(BCF). Les échantillons ont été incubés pendant 4 heures à 35°C.

5 5 ml de l'échantillon ont été aspirés, équivalents à 1 ml de sang total, à l'aide d'une seringue.

L'enrichissement d'ADN bactérien a été réalisé par le procédé provenant de Molzym (Allemagne) sans besoin de centrifugation.

10 Préparation du tampon de lyse par ajout de 800 µl d'ES à 160 µl de MoldNAse. Mélanger par pipetage 6x et ajouter toute la solution de MoldNAse à 12800 µl de tampon de lyse que l'on fait suivre par mélange par pipetage 6x.

15 Préparation de Protéinase K. Ajouter 1000 µl d'ES à 400 µl de Protéinase K et mélange par pipetage 6x.

Lyse

20 Ajouter 5 ml d'échantillon retiré à partir du BCF à 4300 µl de tampon de Lyse-MoldNAse et mélanger par pipetage 8x. Incuber à 45°C pendant 10 minutes.

Inactiver MoldNAse et ajouter 350 µl de Protéinase K au lysat et mélanger par pipetage 8x.

25 Incuber à 45°C pendant 10 minutes.

Capturer un échantillon sur colonne et laver, 3 cycles.

30 Ajouter 605 µl de lysat à une colonne de filtration (Molzym, Allemagne), appliquer 15 secondes de vide. Ajouter 500 µl de RS à la colonne de filtration et appliquer 15 secondes de vide. Ajouter 605 µl de lysat à une colonne de filtration (Molzym, Allemagne), appliquer 30 secondes de

vide. Ajouter 500 µl de RS à la colonne de filtration et appliquer 15 secondes de vide. Ajouter 605 µl de lysat à une colonne de filtration (Molzym, Allemagne), appliquer 45 secondes de vide. Ajouter 500 µl de RS à la colonne de 5 filtration et appliquer 15 secondes de vide. Continuer avec 45 secondes de vide après l'ajout d'échantillon jusqu'à ce que tout l'échantillon ait été ajouté. Plus d'un filtre peut être utilisé afin de filtrer le lysat, si nécessaire, si le filtre devient obstrué au cours de la filtration.

10

Préparation du tampon de lyse pour les microbes

Ajouter 5,6 µl de β-mercaptopropanoïde à 600 µl de RL et mélanger par pipetage 6x. Ajouter tout le BM-RL prétrétré 15 à 80 µl de BugLysis et mélanger par pipetage 6x.

Lyse de microbes

Ajouter 170 µl du mélange de lyse préparé à la 20 colonne et appliquer le vide pendant 200 ms. Incuber à 45°C pendant 10 minutes. Ajouter 280 µl de solution de Protéinase K préparée à 520 µl de tampon RP. Mélanger par pipetage 6x. Ajouter 200 µl de PK-RP à la colonne. Appliquer le vide pendant 200 ms. Incuber à 45°C pendant 10 minutes.

25

Liaison de l'ADN microbien à la colonne

Déplacer la colonne à un bloc à température ambiante. Attendre pendant 2 minutes. Ajouter 500 µl de CSAB 30 à la colonne. Appliquer le vide pendant 2 secondes.

Lavage 1

Ajouter 500 µl de WB à la colonne. Appliquer le vide pendant 2 secondes.

Lavage 2

5 Ajouter 500 µl de WS à la colonne. Appliquer le vide pendant 2 secondes.

Séchage de la membrane

10 Appliquer le vide pendant 10 minutes

Elution

Ajouter 200 µl d'ET à la colonne

15 Appliquer le vide pendant 200 ms.

Incuber à température ambiante pendant au moins 5 minutes

Appliquer le vide pendant 1 minute

Répéter une fois pour faire deux éluctions.

20 Le test moléculaire a été effectué sur l'échantillon d'ADN bactérien enrichi par le procédé dans Göransson et al, 2012 (supra). Durant le procédé d'identification moléculaire des bactéries, l'échantillon sanguin restant est conservé sous agitateurs.

25

Les sondes cadenas et les sondes de capture de cible ont été commandées auprès de Integrated ADN Technologies (Munich, Allemagne). Les sondes ont été conçues pour détecter des motifs uniques dans chaque bactérie, 30 sélectionnées par l'intermédiaire d'outils bioinformatiques. L'hybridation de sondes de capture et la ligature de sondes cadenas à l'ADN cible ont été réalisées simultanément, et ont été obtenues par incubation d'ADN génomique fragmenté et

dénaturé dans Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), KCl 25 mM, MgCl₂ 10 mM, NAD 0,5 mM, 0,01 % Triton® X-100, sonde cadenas 100 nM, sonde de capture 50 nM, 0,2 µg/µl de BSA (New England Biolabs, MA, Etats-Unis) et 250 mU/µl d'Ampligase (Epicentre Biotechnologies, WI, Etats-Unis) à 55°C pendant 5 minutes.

5 L'ADN cible conjointement avec les sondes cadenas réagies ont été capturés sur des particules magnétiques par l'intermédiaire des sondes de capture biotinylées. Ceci a été obtenu par ajout de 50 µg de billes Dynabeads MyOneTM

10 Streptavidin T1 (Invitrogen) à la réaction d'hybridation/de ligature et incubation de l'échantillon à température ambiante pendant 3 minutes. Les sondes en excès ont été éliminées par lavage une fois avec 100 µl de tampon de lavage contenant Tris-HCl 5 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, NaCl 1M et 0,1 %

15 de Tween-20. L'élimination des sondes cadenas linéaires en excès est réalisée, puisque celles-ci peuvent autrement interférer négativement avec la réaction de RCA ultérieure.

Les sondes ayant réagi ont été amplifiées par C2CA,

20 qui comprend des réactions enzymatiques en série commençant par RCA. La réaction de RCA a été initiée par l'ajout de 20 µl de mélange de ligature contenant 1× tampon d'ADN polymérase phi29 (Fermentas, Lituanie ; Tris-acétate 33 mM (pH 7,9 à 37°C), Mg-acétate 10 mM, K-acétate 66 mM, 0,1 %

25 (volume/volume) de Tween-20, DTT 1 mM), dNTPs 100 µM, 0,2 µg/µl de BSA, amorce 25 nM et 100 mU/µl d'ADN polymérase phi29. La réaction a été incubée à 37°C pendant 11 minutes, et inactivée à 65°C pendant 1 minute. Les produits de RCA ont été digérés à 37°C pendant 1 minute par l'ajout de 3 unités

30 d'AluI (New England Biolabs), des oligonucléotides de réPLICATION 600 nM, 0,2 µg/µl de BSA dans un tampon d'ADN polymérase phi29 1×, et la réaction a été terminée à 65°C pendant 1 minute. Les réactions de ligature, d'amplification

et de marquage ont été réalisées par l'ajout d'un mélange contenant ATP 1,36 mM, dNTPs 100 µM, 0,2 µg/µl de BSA, 28 mU/µl d'ADN ligase T4 et 120 mU/µl d'ADN polymérase phi29 dans du tampon d'ADN polymérase phi29 1x à un volume final de 5 50 µl. Les réactions ont été incubées à 37°C pendant 7 minutes, et terminées à 65°C pendant 1 minute. Ce qui est mentionné ci-dessus a été répété une fois. Après la RCA finale, les produits ont été digérés une fois de plus en monomères. Les RCP sont désormais prêts pour l'analyse.

10

L'échantillon digéré a été transféré à un microréseau, incubé à 55°C pendant 30 minutes que l'on fait suivre par un lavage avec 1x SSC à température ambiante. Les monomères de RCA hybridés sont ensuite marqués par hybridation d'un oligo détecteur à une concentration de 10 nM dans 2xSSC à 55°C pendant 30 minutes, lavés deux fois dans 1xSSC à température ambiante et séchés par centrifugation.

20 Le réseau a été ensuite balayé dans un dispositif de balayage de réseau et le résultat analysé à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image de réseau comme suit.

25 L'image de réseau est évaluée de façon à détecter des points correspondants à un ou plusieurs pathogènes. Un point lumineux correspond à un pathogène détecté, avec une redondance de trois points par pathogène. En outre, le réseau a des points de référence utilisés pour l'alignement d'images, qui sont toujours lumineux, et les points de référence de protocole qui - s'ils sont lumineux - vérifient 30 que les étapes individuelles du protocole moléculaire ont réussi. L'analyse est divisée en les étapes suivantes :

1. Les points de référence sont détectés et l'image est alignée en fonction.

5 2. Les intensités de points et les bruits de fond sont mesurés et les valeurs corrigées de bruit de fond sont calculées.

10 3. Les intensités mesurées sont compensées pour le bruit de fond spécifique d'un pathogène, tel que par exemple la liaison non spécifique d'ADN à partir d'ensembles de sondes correspondant à d'autres pathogènes.

15 4. Les données d'intensité de réseau sont utilisées pour fournir une réponse sur la ou les identités de pathogène et une valeur de qualité

a. L'algorithme prend en compte la valeur d'intensité de tous les points répliqués correspondant à un pathogène spécifique lorsqu'il calcule la réponse d'ID.

20 b. La réponse d'ID peut être qualitative (rapporter la présence d'un pathogène) et/ou quantitative (rapporter une indication de la quantité de pathogène présent dans l'échantillon)

25 c. Les points de référence du protocole sont évalués de façon à vérifier que le protocole moléculaire a réussi.

5. Le résultat est collecté et peut être transféré à une analyse AST en aval et/ou rapporté dans un rapport de résultat. Le résultat comprend :

30 a. L'ID du ou des pathogènes détectés
b. Des valeurs semi quantitatives pour chaque pathogène détecté

c. Une valeur de qualité indiquant le taux de succès du protocole moléculaire.

Une image de réseau d'échantillon est présentée 5 dans la Figure 1A. Les cinq points le long des bords de la plaque sont des points de référence et sont utilisés pour l'alignement d'image. Les points les plus brillants indiquent un pathogène détecté (*E. coli*). La Figure 1B montre qu'un signal fluorescent a été spécifiquement généré pour *E. coli*.

10

Exemple 2- Test AST sur la culture sanguine de l'Exemple 1.

5 ml provenant de l'échantillon restant dans la bouteille de culture sanguine qui a continué à être dans des 15 conditions de culture durant le typage moléculaire ont été retirés du flacon.

L'échantillon prélevé a été enrichi en bactéries et en même temps le milieu de culture a été changé, dans ce cas 20 vers un milieu de Mueller-Hinton (milieu MH). Les bactéries *E. coli* ont été récupérées par l'intermédiaire de la filtration à travers un filtre de 0,2 µm puis les bactéries récupérées ont été remises en suspension dans le milieu MH. Des aliquotes de 63 µl de la suspension bactérienne ont été 25 transférées dans des puits sélectionnés dans une plaque de microtitration.

Chaque puits avait une concentration différente 30 d'antibiotiques ainsi que différents antibiotiques. Alors que le microorganisme identifié dans l'Exemple 1 était *E. coli* dans ce cas, les antibiotiques suivants ont été sélectionnés pour l'utilisation dans un test de susceptibilité antimicrobienne : Ciprofloxacine, Pipéracilline + Tazobactam,

Céfotaxime, Ceftazidime, Méropénème et Gentamicine. Une série de six concentrations différentes a été préparée pour chaque antibiotique sur la base de valeurs de CMI cliniques connues. Un septième puits contenant le bouillon MH et aucun 5 antibiotique est utilisé comme témoin positif. La plaque de microtitration a été incubée à 35°C pendant 4 heures avant que la plaque soit lue. 7 µl de marqueur Vybrant® DyeCycleTM Orange 10 µM (Molecular Probes® Life Technologies) ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 30 minutes à 37°C. 10 Chaque puits de microtitration a été imagé et le nombre de bactéries ont été comptés. La croissance différentielle par rapport au témoin positif a été utilisée pour déterminer la valeur de CMI pour les bactéries. Le résultat pour la Ciprofloxacine est présenté dans la Figure 2.

15

Exemple 3 - Détermination des profils d'AST à l'aide du comptage de bactéries individuelles dans un instrument de type cytométrie de flux (Aquila 400, Q-linea AB, Suède).

20

Les bactéries ont été mises en croissance dans une culture sanguine tel que décrit dans l'Exemple 1. 5 ml provenant de l'échantillon restant dans la bouteille de culture sanguine, qui a continué à être dans des conditions de culture durant le typage moléculaire, ont été prélevés à 25 partir du flacon.

30

L'échantillon a été enrichi en bactéries et en même temps le milieu de culture a été changé, dans ce cas vers le milieu de Mueller-Hinton (milieu MH). Les bactéries *E. coli* ont été récupérées par l'intermédiaire de la filtration à travers un filtre de 0,2 µm et les bactéries récupérées ont été remises en suspension dans un milieu MH à une concentration d'approximativement 10⁸ CFU/ml dans le bouillon

de Müller Hinton avant d'être diluées à approximativement 10^6 CFU/ml dans le bouillon de Müller Hinton.

Des solutions d'antibiotique ont été préparées dans
5 une série de dilutions en série 2:1 dans un bouillon de Müller Hinton à des concentrations de test 10x. La plage de concentrations d'antibiotique a été choisie sur la base de l'identité des bactéries et de l'antibiotique. Alors que le microorganisme identifié dans l'Exemple 1 était *E. coli* dans
10 ce cas, les antibiotiques suivants ont été sélectionnés pour l'utilisation dans le test de susceptibilité antimicrobienne : Ciprofloxacine, Pipéracilline + Tazobactam, Céfotaxime, Ceftazidime, Méropénème et Gentamicine. Une série de huit concentrations différentes a été sélectionnée sur la
15 base de valeurs de CMI cliniques connues. Huit tubes d'échantillon contenant 100 µl de solution d'antibiotique à huit concentrations différentes et 800 µl de bouillon de Müller Hinton ont été préparés. Un tube supplémentaire contient 900 µl de bouillon de Müller Hinton et aucun
20 antibiotique comme témoin positif. 100 µl de suspension bactérienne (10^6 CFU/ml) ont été ajoutés aux neuf tubes. Un échantillon témoin négatif comprenant 1000 µl de bouillon de Müller Hinton (à savoir pas de bactérie) est préparé comme témoin négatif.

25

Tous les tubes ont été incubés à 35°C et les échantillons ont été prélevés après 0, 4, 6 et 24 heures. Les échantillons bactériens ont été préparés pour le comptage tel que dans l'Exemple 2. Les profils d'AST bactériens ont été déterminés à l'aide d'un comptage à base de cytométrie de flux de bactéries individuelles dans un instrument Aquila 400 (Q-linea AB, Suède). L'analyse Aquila 400a a été réalisée à l'aide du laser alexa 488.

Il était évident à partir de l'analyse effectuée à différents moments que 4 heures étaient suffisantes pour détecter la croissance bactérienne différentielle aux 5 différentes concentrations d'antibiotiques et par conséquent pour déterminer la susceptibilité d'antibiotique. Des temps plus courts ont été présentés dans la littérature donc ceci n'est pas inattendu. La croissance bactérienne différentielle relative à l'échantillon témoin positif pour chaque 10 antibiotique est présentée dans la Figure 3. Les valeurs de CMI pour chaque antibiotique à différents moments et valeurs seuils ont été calculées sur la base de la croissance bactérienne différentielle. Les valeurs obtenues par ce procédé se comparaient favorablement avec les valeurs de CMI 15 cliniques rapportées auparavant et sont présentées ci-après. Les résultats présentent d'excellentes précision et sensibilité obtenues par comptage de bactéries individuelles plutôt que des mesures de moyennage.

20 Céfotaxime

La CMI avec une dilution de Macrobroth est de 0,125 µg/ml et un autre laboratoire a déterminé une CMI avec un test E ≤ 0,5 µg/ml.

25

Seuil	4 heures	6 heures	24 heures
5 %	-	0,06	0,125
10 %	-	0,06	0,125
15 %	0,06	0,03	0,06
20 %	0,06	0,03	0,06

Ciprofloxacine

- 147 -

La CMI avec une dilution de Macrobroth est de 0,016 µg/ml et un autre laboratoire a déterminé une CMI avec un test E ≤ 0,03 µg/ml.

Seuil	4 heures	6 heures	24 heures
5 %	0,016	0,008	0,008
10 %	0,008	0,008	0,008
15 %	0,008	0,008	0,008
20 %	0,008	0,004	0,008

5

Gentamicine

La CMI avec une dilution de Macrobroth est de 0,5-1 µg/ml et un autre laboratoire a déterminé une CMI avec un test E à 1 µg/ml.

10

Seuil	4 heures	6 heures	24 heures
5 %	1	0,5	1
10 %	0,5	0,5	1
15 %	0,5	0,5	1
20 %	0,5	0,5	1

Méropénème

15

La CMI avec une dilution de Macrobroth est de 0,25-0,5 µg/ml et un autre laboratoire a déterminé une CMI avec un test E ≤ 0,25 µg/ml. La CMI estimée avec une dilution de Macrobroth et avec Aquila 400 est trop élevée puisque un stock ancien d'antibiotiques a été utilisé.

20

Seuil	4 heures	6 heures	24 heures
5 %	-	-	0,5

10 %	-	-	0,5
15 %	-	0,5	0,25
20 %	0,5	0,25	0,125

Ceftazidime

La CMI avec une dilution de Macrobroth est de
5 0,25 µg/ml et un autre laboratoire a déterminé une CMI avec
un test E ≤ 0,5 µg/ml.

Seuil	4 heures	6 heures	24 heures
5 %	0,25	0,125	0,25
10 %	0,25	0,125	0,25
15 %	0,125	0,125	0,25
20 %	0,125	0,125	0,25

Pipéracilline et Tazobactam

10

La CMI avec une dilution de Macrobroth est de 4-
8 µg/ml et un autre laboratoire a déterminé une CMI avec un
test E à 2 µg/ml.

Seuil	4 heures	6 heures	24 heures
5 %	4	4	4
10 %	4	4	4
15 %	4	4	4
20 %	4	2	2

15

Exemple 4 - Procédé avec une détermination d'AST par AST à
l'aide de sondes cadenas et amplification par C2CA.

Les cultures sanguines dopées avec *E. coli* ont été
20 préparées et le typage moléculaire a été effectué tel que

décrit dans l'Exemple 1. 5 ml provenant de l'échantillon restant dans la bouteille de culture sanguine qui a continué à être dans des conditions de culture durant le typage moléculaire, ont été prélevés à partir du flacon et 5 l'échantillon a été enrichi en bactéries et changé dans le milieu MH comme dans l'Exemple 2.

Des aliquotes de 63 µl ont été transférées dans des puits sélectionnés dans une plaque de microtitration. Chaque 10 puits avait une concentration différente d'antibiotiques ainsi que différents antibiotiques. Dans une plaque de microtitration, 12 antibiotiques différents ont été placés, chacun à quatre concentrations différentes et un blanc, à savoir pas d'antibiotique. Après une croissance de 4 heures 15 dans la plaque de microtitration, chaque puits était soumis à une lyse bactérienne pour libérer l'ADN bactérien.

Le test de susceptibilité antibiotique a été réalisé à l'aide d'une Détection de Molécule Unique Amplifiée 20 (ASMD) où l'ADN provenant de pathogènes est extrait à la suite d'un comptage numérique de produits d'amplification, plutôt que par marquage direct de bactéries. Le test de détection moléculaire a été réalisé sur l'échantillon d'ADN bactérien par le procédé dans Göransson et al, 2012.

25

Des sondes cadenas et des sondes de capture de cible ont été commandées auprès de Integrated ADN Technologies (Munich, Allemagne).

30

Les sondes ont été conçues pour détecter des motifs uniques dans chaque bactérie, sélectionnées par l'intermédiaire d'outils bioinformatiques. L'hybridation de sondes de capture et la ligature de sondes cadenas à l'ADN

cible ont été réalisées simultanément, et ont été réalisées par incubation d'ADN génomique fragmenté et dénaturé dans Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), KCl 25 mM, MgCl₂ 10 mM, NAD 0,5 mM, 0,01 % de Triton® X-100, sonde cadenas 100 nM, sonde de capture 50 nM, 0,2 µg/µl de BSA (New England Biolabs, MA, Etats-Unis), et 250 mU/µl d'Ampligase (Epicentre Biotechnologies, WI, Etats-Unis) à 55°C pendant 5 minutes. L'ADN cible conjointement avec les sondes cadenas réagies ont été capturés sur des particules magnétiques par l'intermédiaire des sondes de capture biotinylées. Ceci a été obtenu par ajout de 50 µg de billes Dynabeads MyOne™ Streptavidin T1 (Invitrogen) à la réaction d'hybridation/de ligature et l'incubation de l'échantillon à température ambiante pendant 3 minutes. Les sondes en excès ont été éliminées par lavage une fois avec 100 µl de tampon de lavage contenant Tris-HCl 5 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, NaCl 1M, et 0,1 % de Tween-20. L'élimination des sondes cadenas linéaires en excès est nécessaire, puisque celles-ci interfèreraient autrement négativement avec la réaction de RCA ultérieure.

20

Les sondes ayant réagi ont été amplifiées par C2CA, qui comprend des réactions enzymatiques en série commençant par RCA. La réaction de RCA a été initialisée par l'ajout de 20 µl de mélange de ligature contenant un tampon d'ADN polymérase phi29 1× (Fermentas, Lituanie ; Tris-acétate 33 mM (pH 7,9 à 37°C), Mg-acétate 10 mM, K-acétate 66 mM, 0,1 % (volume/volume) de Tween-20, DTT 1 mM), dNTPs 100 µM, 0,2 µg/µl de BSA, amorce 25 nM et 100 mU/µl d'ADN polymérase phi29. La réaction a été incubée à 37°C pendant 11 minutes, et inactivée à 65°C pendant 1 minute. Les produits de RCA ont été digérés à 37°C pendant 1 minute par l'ajout de 3 unités d'AluI (New England Biolabs), de oligonucléotides de réPLICATION 600 nM, 0,2 µg/µl de BSA dans du tampon d'ADN

polymérase phi29 1x, et la réaction a été terminée à 65°C pendant 1 minute. Les réactions de ligature, amplification et marquage ont été réalisées par ajout d'un mélange contenant ATP 1,36 mM, dNTP 100 µM, 0,2 µg/µl de BSA, 28 mU/µl d'ADN 5 ligase T4 et 120 mU/µl d'ADN polymérase phi29 dans du tampon d'ADN polymérase phi29 1x à un volume final de 50 µl. Les réactions ont été incubées à 37°C pendant 7 minutes, et terminées à 65°C pendant 1 minute. Ce qui est indiqué ci-dessus a été répété une fois.

10

Après la dernière réaction de RCA, les oligonucléotides marqués par fluorescence complémentaires au RCP ont été ajoutés à une concentration de 5 nM chacun. La réaction a été incubée à 65°C pendant 2 minutes que l'on fait 15 suivre par 5 minutes à 37°C et laissée refroidir.

Les échantillons ont ensuite été injectés dans Aquila 400, (demande de brevet américain n° 61/979319) et le nombre de produits de RCP ont été enregistrés tel que décrit 20 dans Jarvius et al, 2006 (Jarvius J., et al, Nature Methods 3, 725 - 727 (2006)). Le nombre de produits de RCP détectés pour l'échantillon bactérien mis en croissance à chaque concentration de Ciprofloxacine et Céfotaxime est présenté 25 dans la Figure 4. Ces données ont été utilisées pour estimer une concentration CMI pour chaque antibiotique.

Exemple 5 - Stratégie pour la conception de sonde.

L'identification du pathogène peut être réalisée en 30 multiplex. Pour ceci, chacun des pathogènes inclus a jusqu'à trois oligonucléotides de capture spécifiques utilisés pour sélectionner l'ADN cible. Chaque pathogène a également jusqu'à trois sondes cadenas spécifiques s'hybridant à la

cible à proximité des oligonucléotides de capture respectifs. Le processus pour concevoir des ensembles de sondes ASMD peut être divisé en deux étapes principales : trouver des régions cibles optimales et concevoir les séquences de sonde.

5

Ci-après les détails supplémentaires du procédé de conception : Trouver des cibles génomiques - Acquérir des séquences génomiques microbiennes à partir d'une base de données de génome (par exemple, NCBI) - Partitionner des séquences génomiques en des groupes cibles et arrière-plan. - Si plus d'un génome cible, rechercher des séquences communes à tous. - Appliquer un ensemble de filtres pour éliminer les candidats à faible complexité (homopolymères, %-GC élevé/faible, répétitions, etc.) - Filtration d'arrière-plan : les candidats ayant une similarité de séquence élevée vis-à-vis de génomes dans le partitionnement d'arrière-plan sont éliminés. - Rapporter les candidats acceptés. Fabriquer les sondes - Charger les cibles génomiques contre lesquelles les sondes seront conçues (sélectionnées dans l'étape ci-dessus) - Choisir les réglages (longueur de sonde, températures de fusion, filtre hétéro/homodimère, filtre de ligature, etc.) - Trouver les séquences de sonde optimales. - Présenter les candidats passés et un court résumé de conception.

25

Les sondes utilisées pour la filtration et la reconnaissance des cibles d'ADN génomique sont fabriquées tel que présenté dans la Figure 5. La sonde de capture amène les fragments cibles sur une phase solide, et le cadenas ensuite se lie à sa cible, est ligaturé en un cercle et est amplifié dans la réaction de C2CA ultérieure. Le cadenas a deux parties complémentaires de cible (bras 5'/3') et un squelette avec des sites pour la détection (générique), la digestion de restriction et amorçage (générique), et l'hybridation d'oligo

- 153 -

de réseau (unique). Les parties de squelette sont appelées DO, RO et AO dans la Figure 5. L'oligo de capture consiste en une partie complémentaire de cible, un lieur CT et une biotine pour la fixation à la phase solide.

REVENDICATIONS

1 - Procédé de détection et de caractérisation d'un microorganisme dans un échantillon clinique, ledit procédé 5 comprenant :

a) introduire un échantillon clinique dans un premier récipient de culture contenant un milieu de culture ;

10 b (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du premier récipient de culture dans un compartiment (3) isolé thermiquement d'un conteneur (1) pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour une préculture de l'échantillon, le compartiment (3) isolé thermiquement et le 15 chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver l'échantillon clinique ;

20 b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit premier récipient de culture ;

25 b (iii)) facultativement retirer une partie de la culture d'échantillon clinique à partir dudit premier récipient de culture, et introduire ladite partie dans un second récipient de culture contenant un milieu de culture, et facultativement précultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

30 c) retirer une aliquote de test à partir dudit premier et/ou second récipient de culture, et continuer à cultiver ledit échantillon clinique et/ou ladite partie dans ledit premier et/ou second récipient de culture ;

et séparer l'ADN à partir de l'aliquote de test et réaliser des tests d'acide nucléique sur l'ADN pour

identifier un microorganisme et/ou pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans le microorganisme, et/ou déterminer la susceptibilité antimicrobienne d'un
5 microorganisme dans l'échantillon clinique.

2 - Procédé selon la revendication 1, dans lequel les tests d'acide nucléique sont effectués à l'aide de :

10 i) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et/ou

15 ii) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique
20 représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne.

25 3 - Procédé selon la revendication 1, dans lequel ledit ou lesdits tests comprennent la réalisation d'un test de susceptibilité antimicrobienne sur un échantillon clinique cultivé et/ou une partie provenant de l'étape (c), la croissance microbienne dans le test de susceptibilité antimicrobienne étant surveillée par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance.
30

4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ledit procédé comprenant :

a) introduire un échantillon clinique dans un premier récipient de culture contenant un milieu de culture ;

5 b (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du premier récipient de culture dans un compartiment (3) isolé thermiquement d'un conteneur (1) pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon, le compartiment (3) isolé thermiquement et le chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver l'échantillon clinique ;

10 15 b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit premier récipient de culture ;

20 b (iii)) facultativement retirer une partie de la culture d'échantillon clinique à partir dudit premier récipient de culture, et introduire ladite partie dans un second récipient de culture contenant un milieu de culture, et facultativement précultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

25 c) retirer une aliquote de test à partir dudit premier et/ou second récipient de culture, et continuer à cultiver ledit échantillon clinique et/ou ladite partie dans ledit premier et/ou second récipient de culture ;

d) séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test ;

30 e) réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, lesdits tests d'acide nucléique étant réalisés à l'aide de :

5 i) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

10 ii) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

15 et il est détecté si lesdites sondes et/ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces se sont étendues ou non (par exemple une réaction d'amplification a eu lieu) ; et

20 f) si un microorganisme est identifié dans l'étape (e), réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ledit échantillon clinique cultivé et/ou ladite partie provenant de l'étape (c), la croissance microbienne dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant surveillée par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la concentration d'agents 25 antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés dans l'étape (e), et facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique et/ou ladite partie dans ledit premier et/ou second récipient de culture.

30 5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ledit procédé comprenant :

a) introduire un échantillon clinique dans un récipient de culture contenant un milieu de culture ;

5 b (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du récipient de culture dans un compartiment (3) isolé thermiquement d'un conteneur (1) pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de l'échantillon, le compartiment (3) isolé thermiquement et le 10 chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver l'échantillon clinique ;

15 b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit flacon de récipient de culture ;

c) retirer une aliquote de test à partir dudit récipient de culture, et continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit récipient de culture ;

20 d) séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test ;

25 e) réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, lesdits tests d'acide nucléique étant réalisés à l'aide de :

30 i) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes et/ou amorces se sont hybridées ou non au dit ADN et/ou si lesdites amorces se sont étendues (par exemple une réaction d'amplification a eu lieu) ; et

f) si un microorganisme est identifié dans l'étape (e), réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ledit échantillon clinique cultivé provenant de l'étape (c), la croissance microbienne dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant surveillée par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la concentration des agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés dans l'étape (e), et facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit récipient de culture.

6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ledit procédé comprenant :

a) introduire un échantillon clinique dans un premier récipient de culture ;

b) (i)) simultanément transporter et incuber l'échantillon clinique, ledit transport et ladite incubation comprenant le placement du premier récipient de culture dans un compartiment (3) isolé thermiquement d'un conteneur (1) pouvant être scellé, le chauffage de l'échantillon clinique à

une température appropriée pour la préculture de l'échantillon, le compartiment (3) isolé thermiquement et le chauffage étant utilisés pour maintenir l'échantillon clinique à la température appropriée pour la préculture durant le transport de l'échantillon, permettant ainsi de précultiver l'échantillon clinique ;

5 b (ii)) facultativement continuer à cultiver ledit échantillon clinique dans ledit premier récipient de culture ;

10 b (iii)) retirer une partie de la culture d'échantillon clinique à partir dudit premier récipient de culture, et introduire ladite partie dans un second récipient de culture contenant un milieu de culture et facultativement précultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

15 c) retirer une aliquote de test à partir dudit second récipient de culture, et continuer à cultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture ;

d) séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test ;

e) réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, lesdits tests d'acide nucléique étant réalisés à l'aide de :

i) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

30 ii) une ou plusieurs sondes et/ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance

antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;
5 et il est détecté si lesdites sondes et/ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces se sont étendues (par exemple une réaction d'amplification a eu lieu) ; et
10 f) si un microorganisme est identifié dans l'étape (e), réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ladite partie cultivée provenant de l'étape (c), la croissance microbienne dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant surveillée par l'évaluation de la
15 croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la concentration des agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés dans l'étape (e), et
20 facultativement continuer à cultiver ladite partie dans ledit second récipient de culture.

7 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, dans lequel ledit échantillon clinique et/ou ladite partie est encore cultivé après l'étape (f) si aucune souche de microorganisme n'est identifiée dans l'étape (e) pour permettre à de nouveaux tests d'identification microbienne et de susceptibilité antimicrobienne d'être réalisés pour identifier le microorganisme et déterminer son
30 profil de résistance antimicrobienne.

8 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel l'échantillon est agité durant l'étape (b)(i).

5 9 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel l'échantillon clinique est maintenu à une température de 25-35°C pour la préculture de l'échantillon, de préférence dans lequel l'échantillon clinique est maintenu à une température de 30-35°C.

10 10 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel la pré-culture est réalisée pendant 1 à 6 heures.

15 11 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans lequel le premier récipient de culture est un flacon de culture de sang.

20 12 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel la croissance microbienne est mesurée avant l'étape (b)(ii), et/ou avant l'étape (c).

25 13 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel la croissance microbienne est évaluée par la détermination de la quantité de matière cellulaire microbienne présente dans un échantillon.

30 14 - Procédé selon la revendication 13, dans lequel la quantité de matière cellulaire microbienne présente dans un échantillon est déterminée par la détermination de la quantité et/ou du nombre et/ou de la taille de microorganismes et/ou de colonies microbiennes ou agrégats microbiens.

15 - Procédé selon l'une des revendications 12 ou 14, dans lequel la quantité de matière cellulaire microbienne présente dans un échantillon est déterminée par imagerie.

5

16 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, dans lequel la quantité de matière cellulaire microbienne présente dans un échantillon est déterminée par la mesure de l'aire de biomasse microbienne par imagerie.

10

17 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel le premier récipient de culture contient un milieu de culture contenant un agent qui neutralise la présence de n'importe quels agents antimicrobiens présents dans l'échantillon clinique.

15

18 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, dans lequel l'ADN microbien est séparé ou enrichi sélectivement à partir de ladite aliquote de test.

20

19 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 18, comprenant en outre une étape de séparation ou d'enrichissement de microorganismes à partir de ou dans l'aliquote de test avant ou simultanément à l'étape (d).

25

20 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 19, dans lequel les étapes (c) à (e) sont répétées une fois ou plusieurs fois.

30

- 164 -

21 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 20, dans lequel, à l'étape (e)(i) et/ou (ii), des sondes d'hybridation sont utilisées.

5 22 - Procédé selon la revendication 21, dans lequel lesdites sondes d'hybridation sont des sondes cadenas comprenant des extrémités 5' et 3' qui peuvent s'hybrider à une séquence nucléotidique d'identification ou de marqueur de résistance antimicrobienne.

10

23 - Procédé selon la revendication 22, dans lequel une sonde cadenas circularisée est détectée par amplification par cercle roulant (RCA).

15

24 - Procédé selon la revendication 23, dans lequel la RCA est ou comprend une amplification cercle à cercle (C2CA) dans laquelle un produit de RCA est clivé en monomères, et les monomères sont circularisés et utilisés comme matrices pour une nouvelle réaction de RCA.

20

25 - Procédé selon l'une des revendications 23 ou 24, dans lequel un produit de RCA est détecté par clivage du produit de RCA en monomères, hybridation desdits monomères sur un réseau et détection des monomères sur le réseau.

25

26 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 24, dans lequel, dans l'étape (f), la croissance microbienne est déterminée par la détection d'un microorganisme directement.

30

27 - Procédé selon la revendication 25, dans lequel les microorganismes sont marqués avec un colorant et détectés.

28 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 26, dans lequel, pour les tests d'acide nucléique de l'étape (e), de l'ADN séparé est immobilisé à 5 l'aide de sondes de capture capables de s'hybrider à l'ADN.

29 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 27, dans lequel l'étape (f) est réalisée si un microorganisme unique est identifié dans l'étape (e).

10

30 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 27, dans lequel, si au moins deux microorganismes sont identifiés dans l'étape (e), l'échantillon clinique et/ou la partie est encore cultivé 15 après l'étape (f) pour permettre à de nouveaux tests d'identification microbienne et de susceptibilité antimicrobienne d'être réalisés pour identifier le microorganisme et déterminer son profil de résistance antimicrobienne.

20

31 - Système de test d'échantillon clinique comprenant :

a) un appareil portatif pour le transport et l'incubation d'un échantillon clinique dans un premier récipient de culture, l'appareil comprenant : un conteneur (1) pouvant être scellé ayant un compartiment (3) isolé thermiquement pour recevoir le premier récipient de culture ; un dispositif de chauffage destiné à chauffer l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de 30 l'échantillon ; et

b) un dispositif de détection de microorganisme configuré pour recevoir ledit premier récipient de culture et

étant agencé pour cultiver l'échantillon clinique, ledit dispositif comprenant :

facultativement un second récipient de culture contenant un milieu de culture ;

5 facultativement un dispositif de retrait de partie pour retirer une partie du contenu du premier récipient de culture et transférer la partie dans le second récipient de culture ;

10 le second récipient de culture étant agencé pour recevoir une culture d'échantillon clinique en tant que partie du contenu du premier récipient de culture, et étant agencé pour cultiver la partie ;

le dispositif comprenant en outre :

15 un dispositif d'extraction d'aliquote de test pour retirer une partie du contenu du premier et/ou second récipient de culture pour une utilisation en tant qu'aliquote de test ; et

20 un dispositif de test d'ADN pour séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test, et réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme ;

25 et/ou un dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ledit échantillon clinique cultivé et/ou ladite partie cultivée par la surveillance de la croissance microbienne par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance ; le dispositif étant destiné à cultiver l'échantillon clinique et/ou la partie après extraction de l'aliquote de test, et facultativement avant l'extraction de l'aliquote de test.

32 - Système de test d'échantillon clinique selon la revendication 31, dans lequel le dispositif de test d'ADN est agencé pour réaliser les tests d'acide nucléique à l'aide de :

5 i. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un

10 microorganisme donné ; et

ii. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier

15 sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont pris part ou non à une réaction d'amplification.

20 33 - Système de test d'échantillon clinique selon la revendication 31, comprenant :

a) un appareil portatif pour le transport et l'incubation d'un échantillon clinique dans un premier

25 récipient de culture, l'appareil comprenant : un conteneur (1) pouvant être scellé ayant un compartiment (3) isolé thermiquement pour recevoir le premier récipient de culture ; un dispositif de chauffage pour chauffer l'échantillon clinique à une température appropriée pour la préculture de

30 l'échantillon ; et

b) un dispositif de détection de microorganisme configuré pour recevoir ledit premier récipient de culture et

étant agencé pour la culture de l'échantillon clinique, ledit dispositif comprenant :

facultativement un second récipient de culture contenant un milieu de culture ;

5 facultativement un dispositif de retrait de partie pour retirer une partie du contenu du premier récipient de culture et transférer la partie dans le second récipient de culture ;

10 le second récipient de culture étant agencé pour recevoir une culture d'échantillon clinique en tant que partie du contenu du premier récipient de culture, et étant agencé pour cultiver la partie ;

le dispositif comprenant en outre :

15 un dispositif d'extraction d'Aliquote de test pour retirer une partie du contenu du premier et/ou second récipient de culture pour l'utilisation en tant qu'Aliquote de test ; et

20 un dispositif de test d'ADN pour séparer l'ADN à partir de ladite Aliquote de test, et réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, le dispositif de test d'ADN étant agencé pour réaliser les tests d'acide 25 nucléique à l'aide de :

i. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une 30 séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance

antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

5 et il est détecté si lesdites sondes ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont pris part ou non à une réaction d'amplification ;

le dispositif de détection de microorganisme étant agencé de telle sorte que : si le microorganisme donné est 10 identifié par le dispositif de test d'ADN, alors l'échantillon clinique cultivé et/ou la partie cultivée produite par le premier récipient de culture et/ou le second récipient de culture par culture après extraction de 15 l'aliquote de test est transmis à un dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ledit échantillon clinique cultivé et/ou la partie cultivée par la surveillance de la croissance microbienne par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la 20 concentration d'agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés par le dispositif de test d'ADN ;

25 le dispositif étant destiné à cultiver l'échantillon clinique et/ou la partie après extraction de l'aliquote de test, et facultativement avant l'extraction de l'aliquote de test.

30 34 - Système de test de système clinique selon la revendication 31, dans lequel le dispositif de détection de microorganisme comprend :

un dispositif d'extraction d'aliquote de test pour retirer une partie du contenu du premier récipient de culture pour l'utilisation en tant qu'aliquote de test ; et

5 un dispositif de test d'ADN pour séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test, et réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le microorganisme et pour détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, le dispositif de
10 test d'ADN étant agencé pour réaliser les tests d'acide nucléique à l'aide de :

i. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou
15 une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;

et il est détecté si lesdites sondes ou amorces se
25 sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont pris part ou non à une réaction d'amplification ;

le dispositif de détection de microorganisme étant agencé de telle sorte que : si le microorganisme donné est identifié par le dispositif de test d'ADN, alors
30 l'échantillon clinique cultivé produit par le premier récipient de culture par la culture après extraction de l'aliquote de test est transmis à un dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un test de

susceptibilité antimicrobienne sur ledit échantillon clinique cultivé par la surveillance de la croissance microbienne par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la concentration d'agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne étant déterminés par l'identité du microorganisme et des marqueurs de résistance antimicrobienne détectés par le dispositif de test d'ADN ;

le dispositif étant destiné à la culture de l'échantillon clinique après l'extraction de l'aliquote de test, et facultativement avant l'extraction de l'aliquote de test.

35 - Système de test d'échantillon clinique selon la revendication 31, dans lequel le dispositif de détection de microorganisme comprend :

un second récipient de culture contenant un milieu de culture ;

un dispositif de retrait de partie pour retirer une partie du contenu du premier récipient de culture et de transférer la partie au second récipient de culture ;

le second récipient de culture étant agencé pour recevoir un mélange d'échantillon clinique/milieu ou une culture d'échantillon clinique comme partie du contenu du premier récipient de culture, et étant agencé pour cultiver la partie ;

le dispositif comprenant en outre :

un dispositif d'extraction d'aliquote de test pour retirer une partie du contenu du second récipient de culture pour une utilisation comme aliquote de test ; et

un dispositif de test d'ADN pour séparer l'ADN à partir de ladite aliquote de test, et réaliser des tests d'acide nucléique sur ledit ADN pour identifier le

microorganisme et détecter la présence ou l'absence d'un ou plusieurs marqueurs génétiques de résistance antimicrobienne dans ledit microorganisme, le dispositif de test d'ADN étant agencé pour réaliser les tests d'acide nucléique à l'aide
5 de :

i. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour l'identification microbienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider spécifiquement à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une
10 séquence nucléotidique qui est identificatrice d'un microorganisme donné ; et

ii. une ou plusieurs sondes ou amorces d'acide nucléique pour la détection de marqueur de résistance antimicrobienne, une telle sonde ou amorce étant capable de s'hybrider à, ou une telle amorce étant capable d'amplifier sélectivement, une séquence nucléotidique représentant un marqueur génétique de résistance antimicrobienne ;
et il est détecté si lesdites sondes ou amorces se sont hybridées ou non audit ADN et/ou si lesdites amorces ont pris
20 part ou non à une réaction d'amplification ;

le dispositif de détection de microorganisme étant agencé de telle sorte que : si le microorganisme donné est identifié par le dispositif de test d'ADN, alors la partie cultivée produite par le second récipient de culture par la
25 culture après l'extraction de l'aliquote de test est transmise à un dispositif de test de susceptibilité antimicrobienne pour réaliser un test de susceptibilité antimicrobienne sur ladite partie cultivée par la surveillance de la croissance microbienne par l'évaluation de la croissance ou de marqueurs pour la croissance, et le type et la concentration d'agents antimicrobiens utilisés dans ledit test de susceptibilité antimicrobienne sont déterminés
30 par l'identité du microorganisme et des marqueurs de

résistance antimicrobienne détectés par le dispositif de test d'ADN ;

le dispositif étant destiné à la culture de la partie après l'extraction de l'aliquote de test, et facultativement avant l'extraction de l'aliquote de test.

36 - Système de traitement d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 31 à 35, dans lequel le dispositif de détection de microorganisme cultive en outre ledit échantillon clinique et/ou ladite partie cultivée dans le premier et/ou second récipient de culture si le microorganisme donné n'est pas identifié par le dispositif de test d'ADN pour permettre à d'autres tests d'identification microbienne et de susceptibilité antimicrobienne d'être réalisés après culture supplémentaire afin d'identifier le microorganisme et de déterminer son profil de résistance antimicrobienne.

37 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 31 à 36, dans lequel la détection de microorganisme est agencée pour effectuer le procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 31.

38 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 31 à 37, dans lequel l'appareil portatif comprend un contrôleur pour commander le dispositif de chauffage afin de maintenir une température préfixée et/ou pour commander un agitateur (16) afin d'appliquer un degré d'agitation prédéterminé.

39 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 31 à 38, dans lequel

l'appareil portatif comprend un détecteur de température (13) pour surveiller la température dans le compartiment.

5 40 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 31 à 39, dans lequel l'appareil portatif comprend un agitateur (16) pour agiter l'échantillon.

10 41 - Système de test d'échantillon clinique selon la revendication 40, dans lequel l'appareil portatif comprend un accéléromètre (20) pour surveiller l'agitation de l'échantillon.

15 42 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une des revendications 39 ou 41, dans lequel l'agitateur (16) comprend une came (16b) excentrique couplé au premier récipient de culture et un moteur qui entraîne la came.

20 43 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 39 à 42, dans lequel l'agitateur (16) assure un montage du premier récipient de culture sur un dispositif de rotation avec un axe de symétrie du premier récipient de culture hors d'alignement avec l'axe de rotation du dispositif de rotation.

25 44 - Système de test d'échantillon clinique selon la revendication 43, dans lequel le dispositif de rotation est une roue (16b) et l'appareil est agencé de telle sorte que le premier récipient de culture est maintenu sur la roue (16b) pour la rotation avec la roue (16b), de telle sorte que le premier flacon de culture a sa base non parallèle à la direction radiale de la roue (16b).

45 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 39 à 44, dans lequel l'appareil portatif comprend un manchon (16c) pour maintenir le premier récipient de culture à l'intérieur du compartiment (3) isolé thermiquement, le manchon (16c) et le premier récipient de culture étant déplacés par l'agitateur (16) de façon à agiter mécaniquement le premier récipient de culture et par là agiter l'échantillon.

10 46 - Système de test d'échantillon clinique selon la revendication 45, dans lequel le manchon (16c) est agencé pour se déformer élastiquement durant l'insertion et le retrait du premier récipient de culture, et pour maintenir le flacon de manière sûre en raison de la résilience du manchon alors que le premier récipient de culture est totalement inséré.

20 47 - Système de test d'échantillon clinique selon la revendication 46, dans lequel le manchon (16c) comprend des dents élastiques disposées pour serrer un épaulement du premier récipient de culture lorsque le premier récipient de culture est inséré, et pour être poussé élastiquement vers l'extérieur et passer autour d'une circonférence du corps principal du premier récipient de culture lorsque le premier récipient de culture est en cours d'insertion ou de retrait.

30 48 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 31 à 47, dans lequel le système de test d'échantillon clinique comprend le premier récipient de culture et dans lequel le premier récipient de culture est un flacon de culture de sang.

- 176 -

49 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 31 à 48, dans lequel l'appareil portatif comprend un détecteur pour déterminer si l'échantillon est positif pour la croissance microbienne.

5

50 - Système de test d'échantillon clinique selon l'une quelconque des revendications 31 à 49, dans lequel le dispositif de test d'ADN est agencé pour utiliser des sondes d'hybridation.

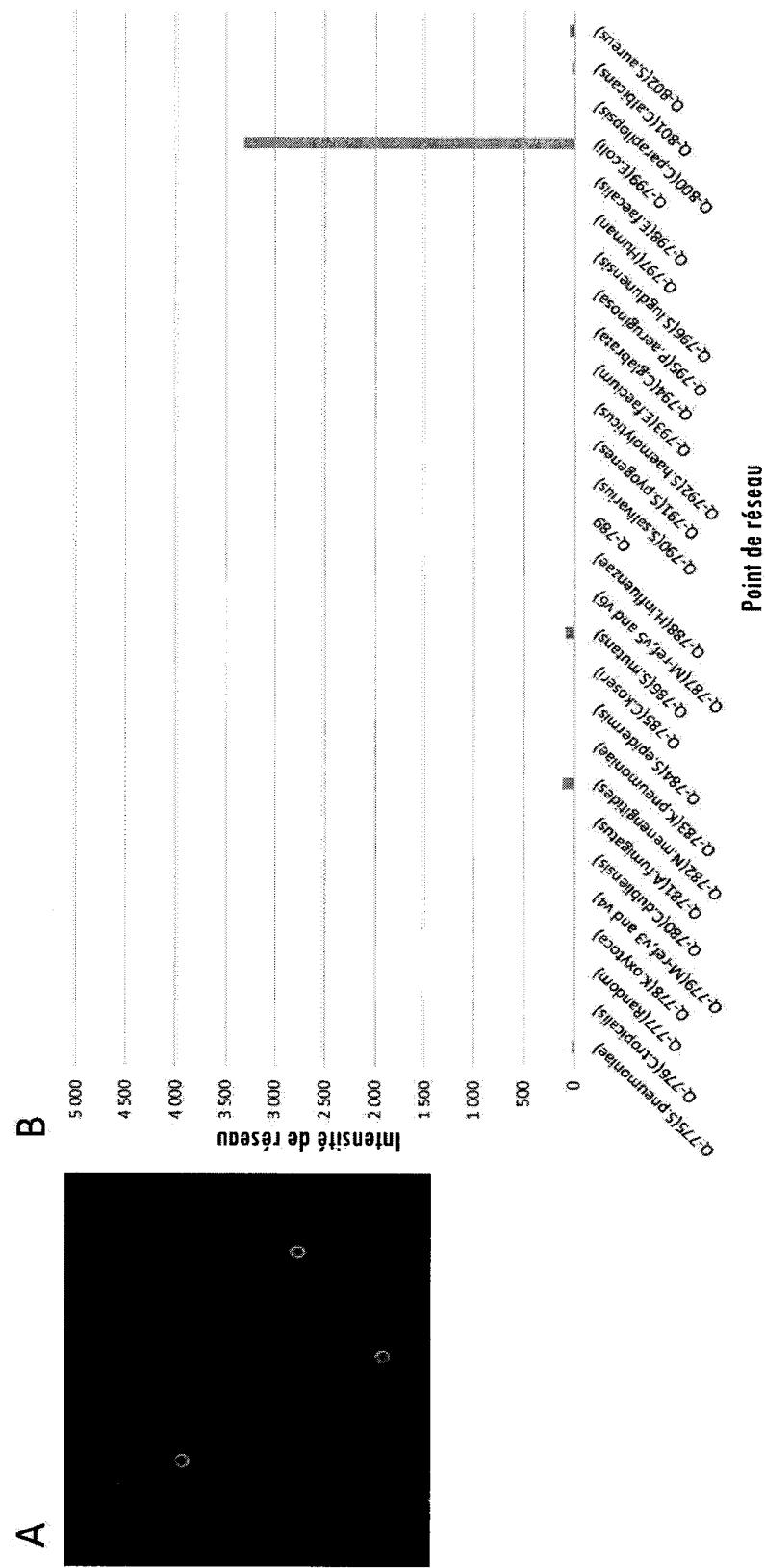
10

51 - Système de test d'échantillon clinique selon la revendication 50, dans lequel lesdites sondes d'hybridation sont des sondes cadenas comprenant des extrémités 5' et 3' qui peuvent s'hybrider à une séquence nucléotidique identificatrice ou de marqueur de résistance antimicrobienne et le dispositif de test d'ADN est agencé pour détecter une sonde cadenas circularisée par une amplification par cercle roulant (RCA).

15

1/12

Figure 1



2/12

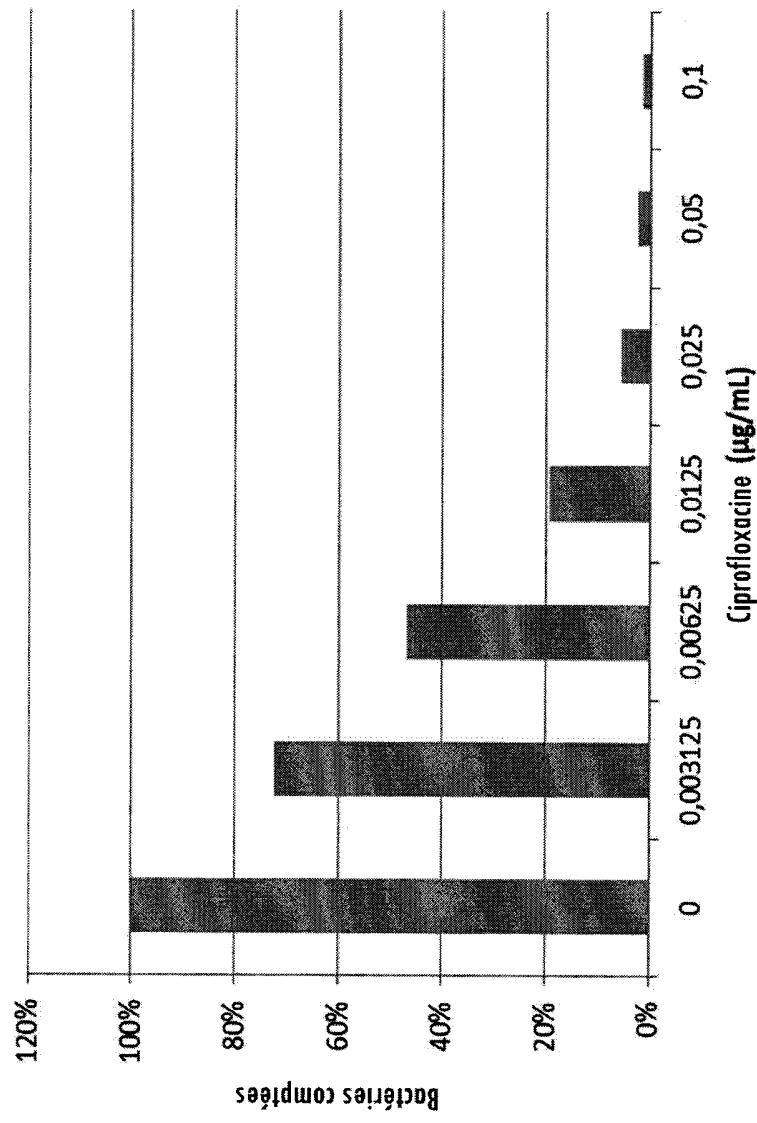
Figure 2

Figure 3

3/12

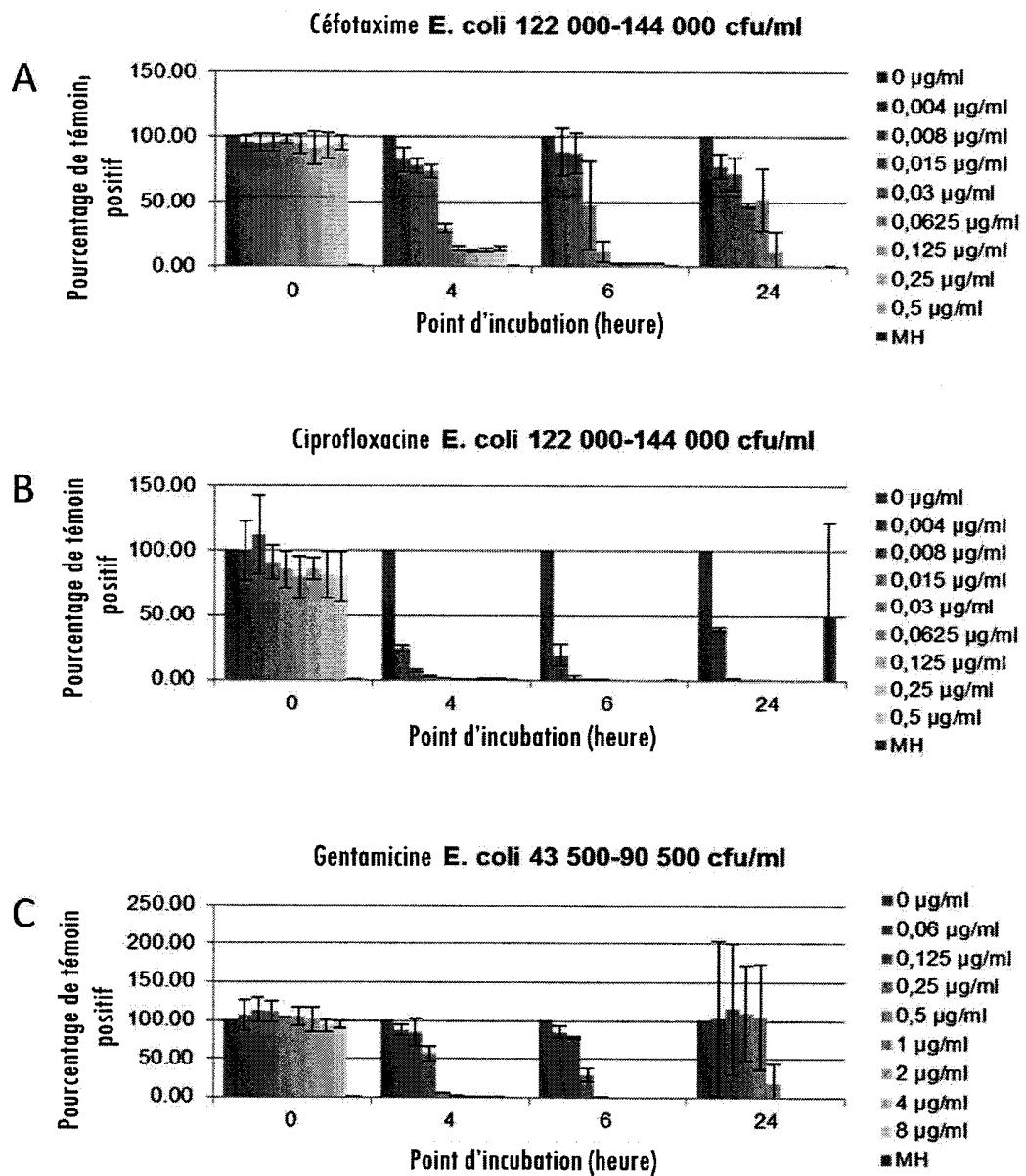
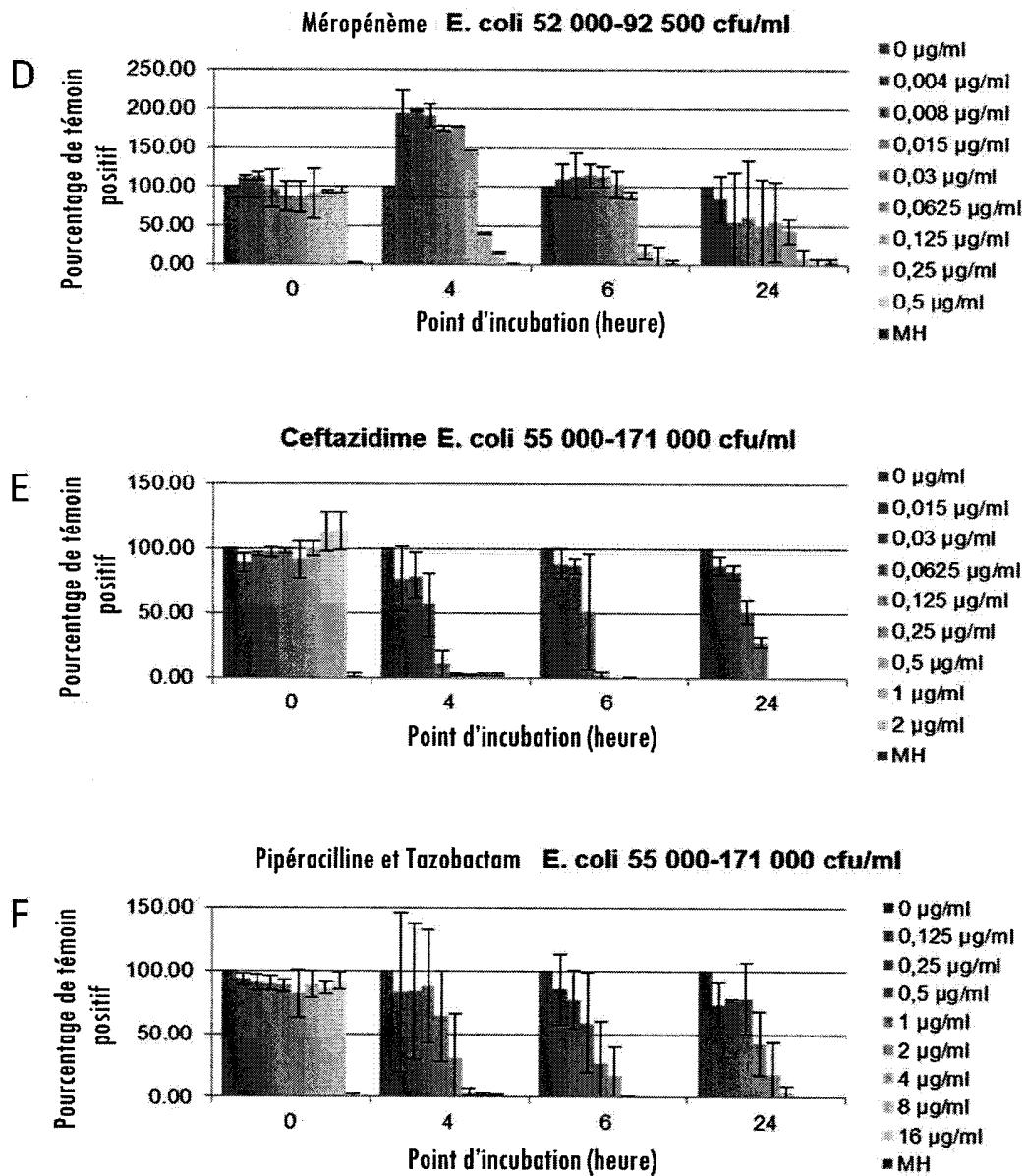
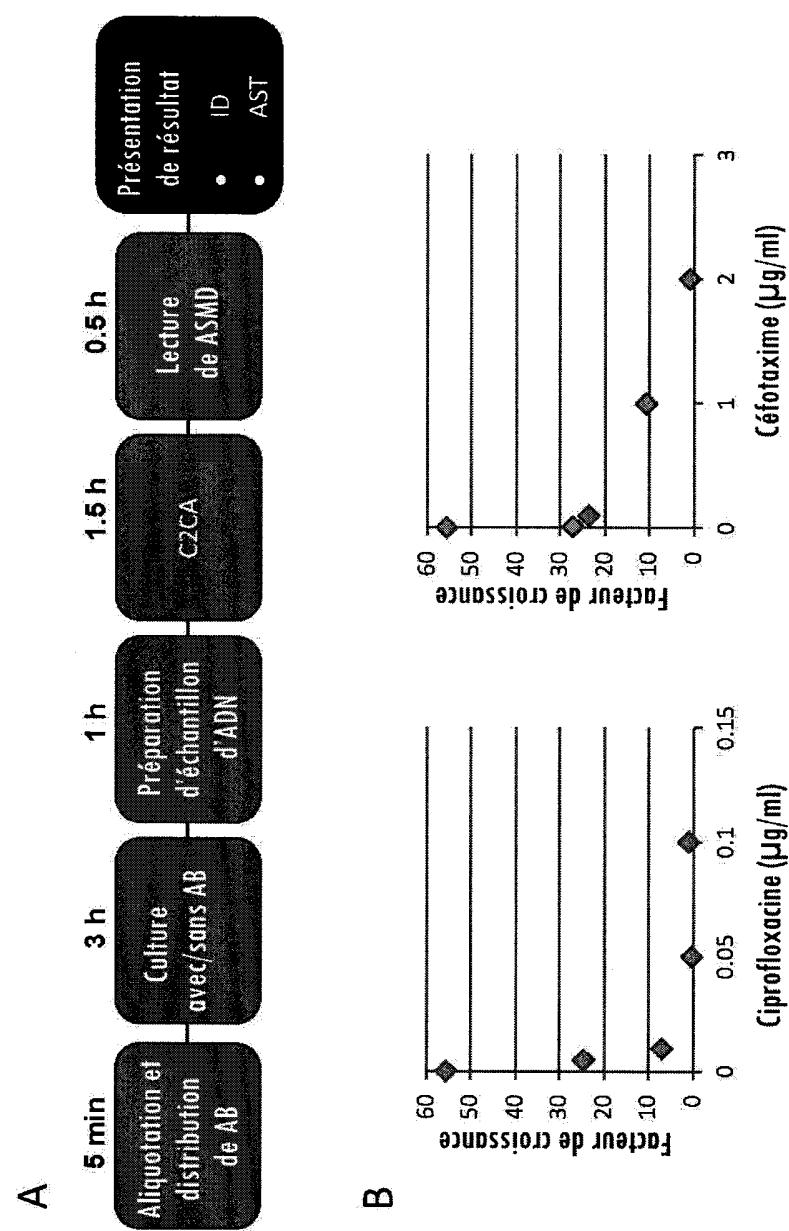


Figure 3 (cont'd)

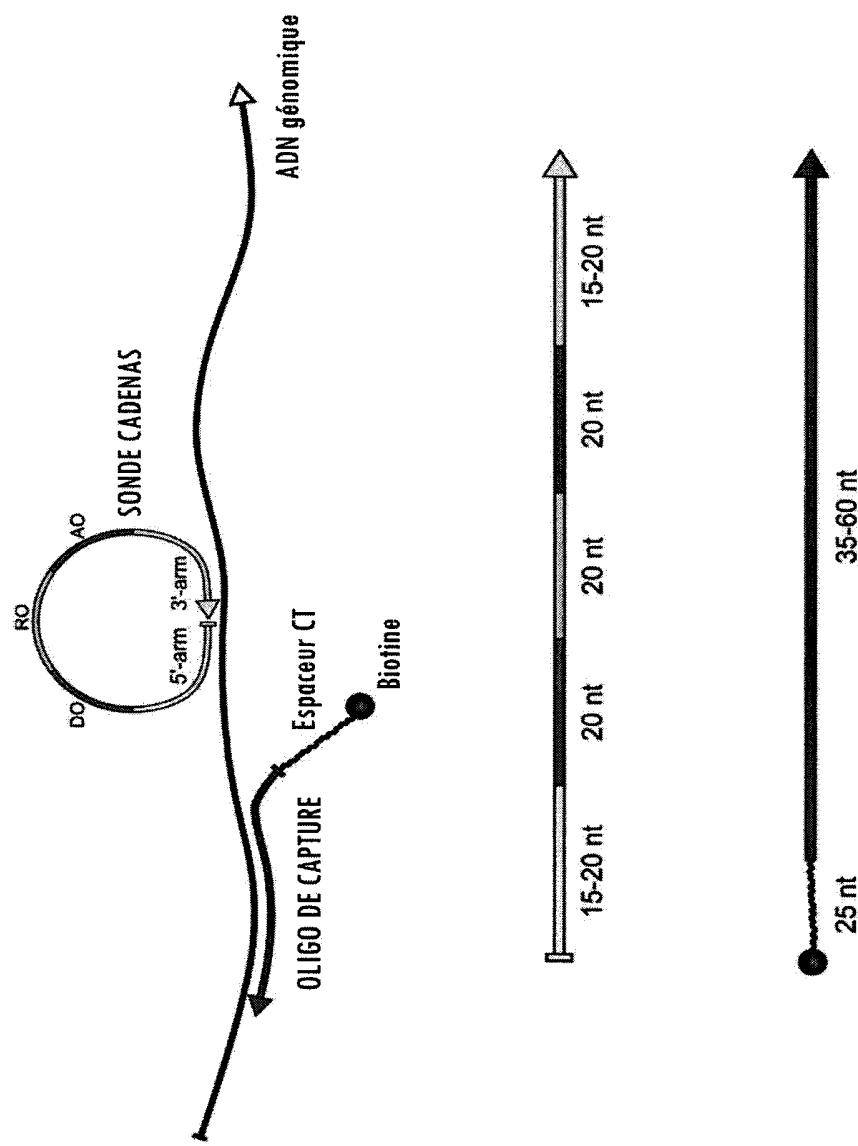
4/12



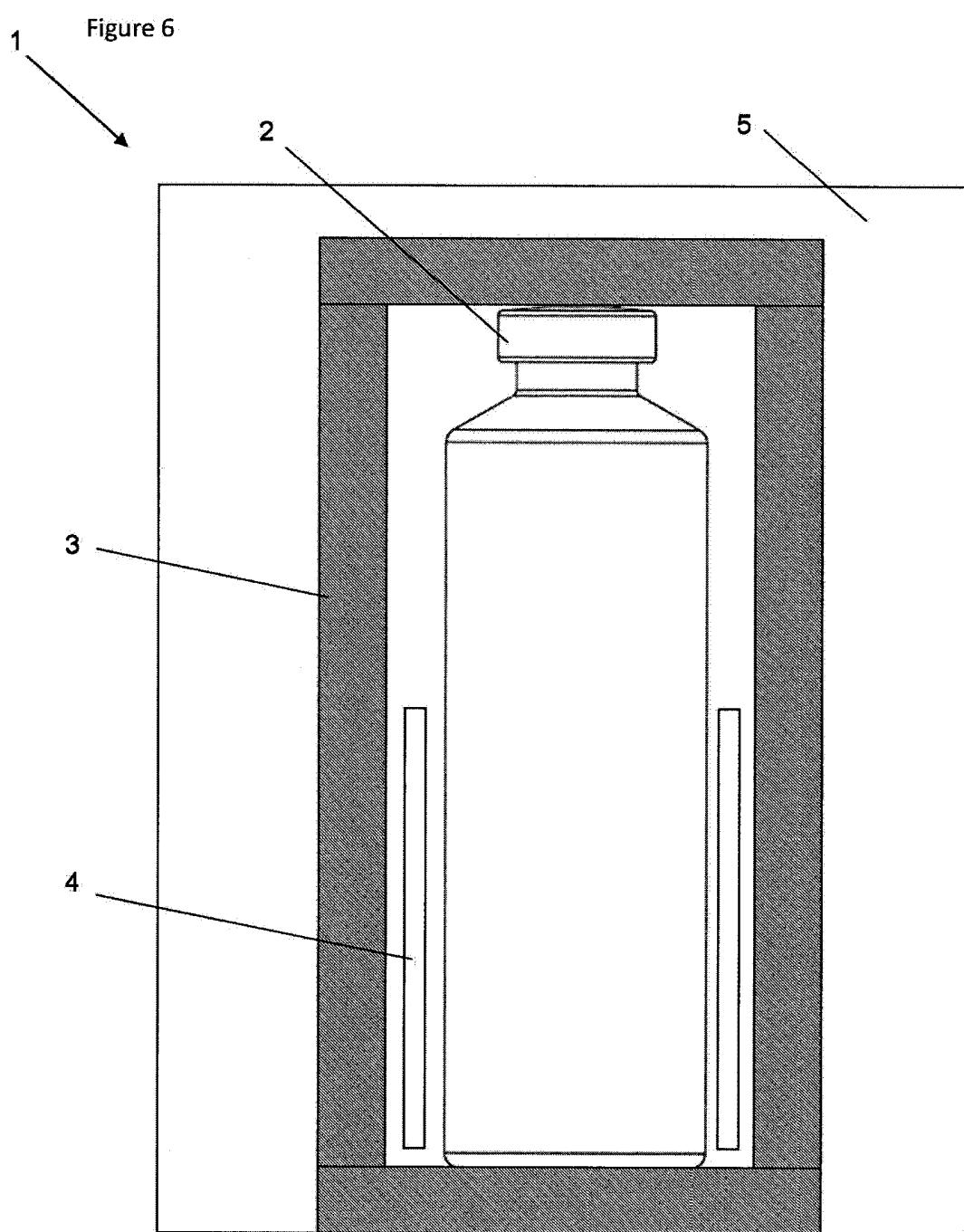
5/12

Figure 4

6/12

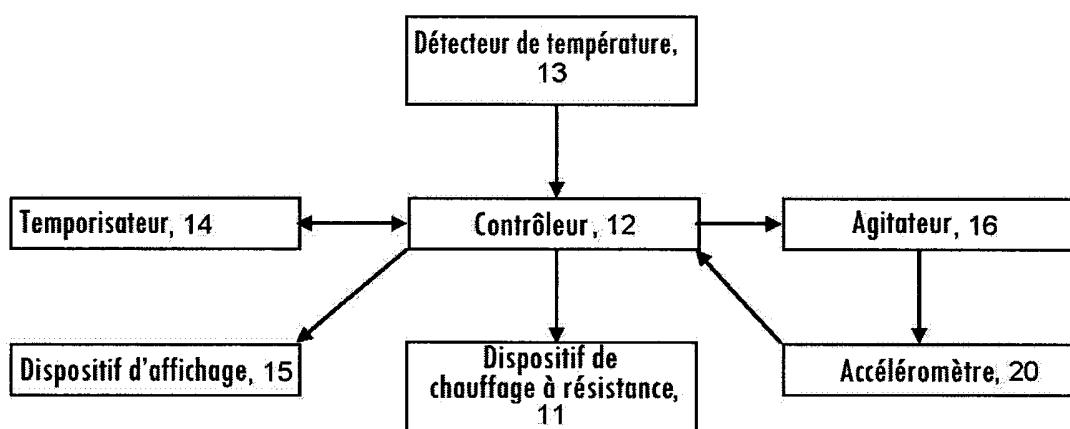
Figure 5

7/12



8/12

Figure 7



9/12

Figure 8

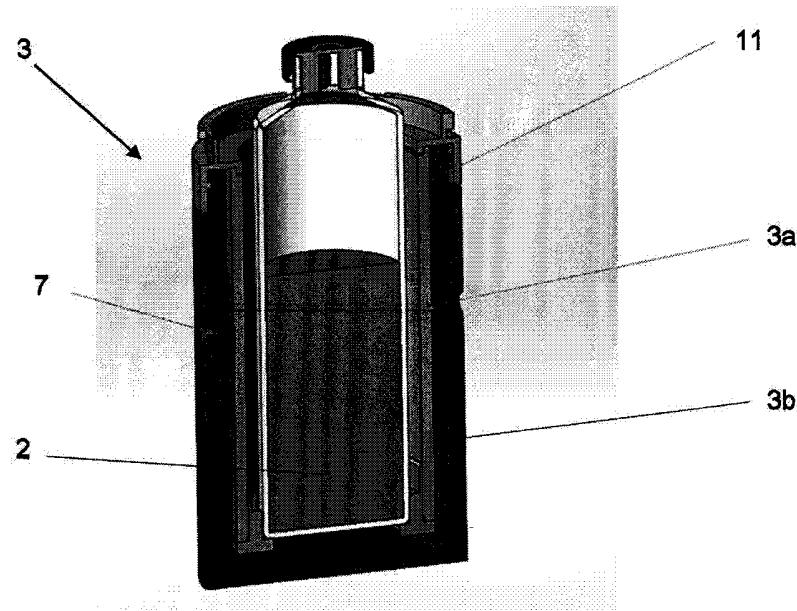


Figure 8a

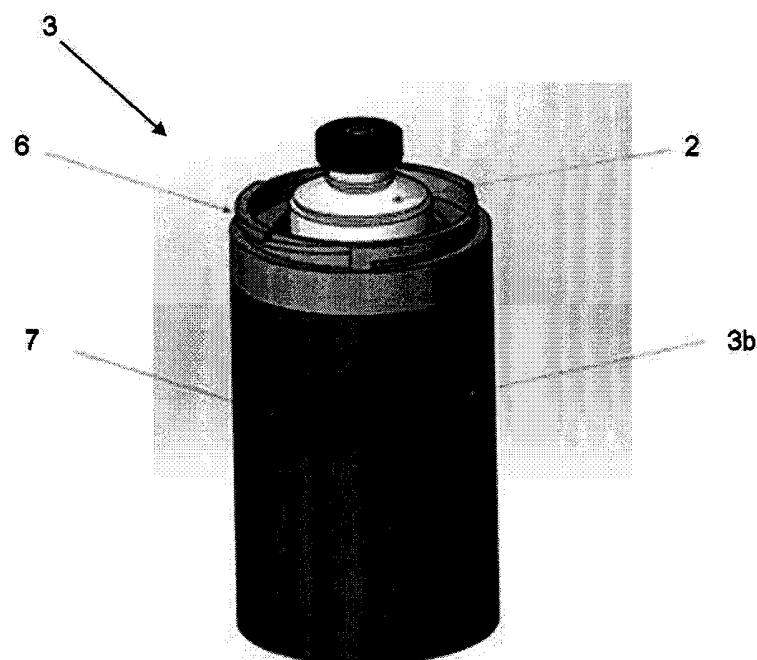
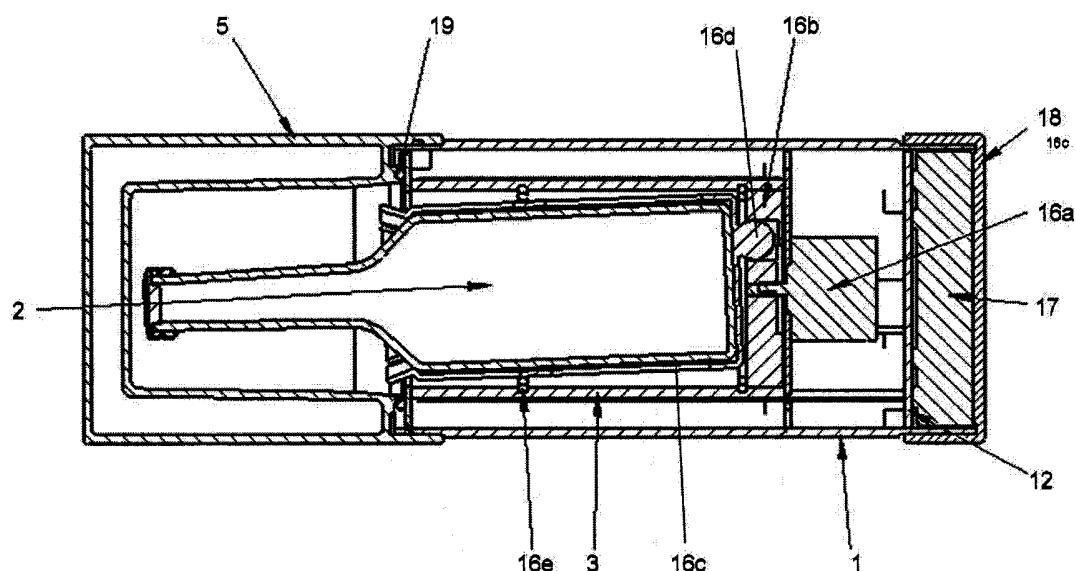


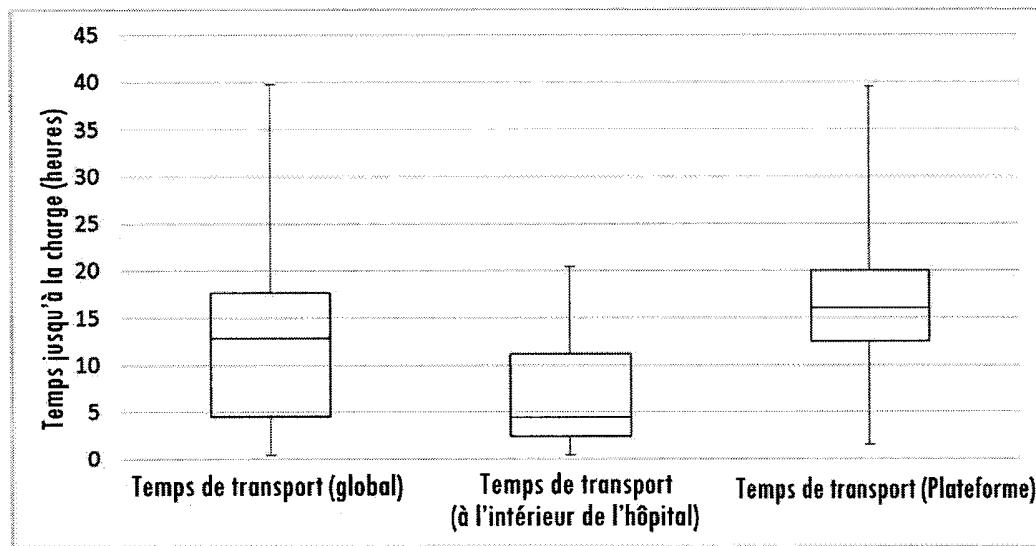
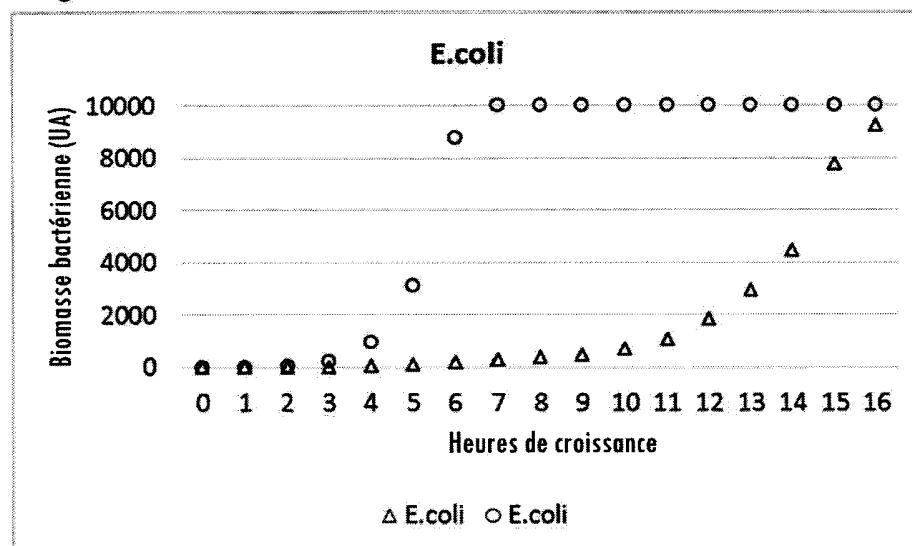
Figure 8b

10/12

Figure 9



11/12

Figure 10**Figure 11a**

12/12

Figure 11b

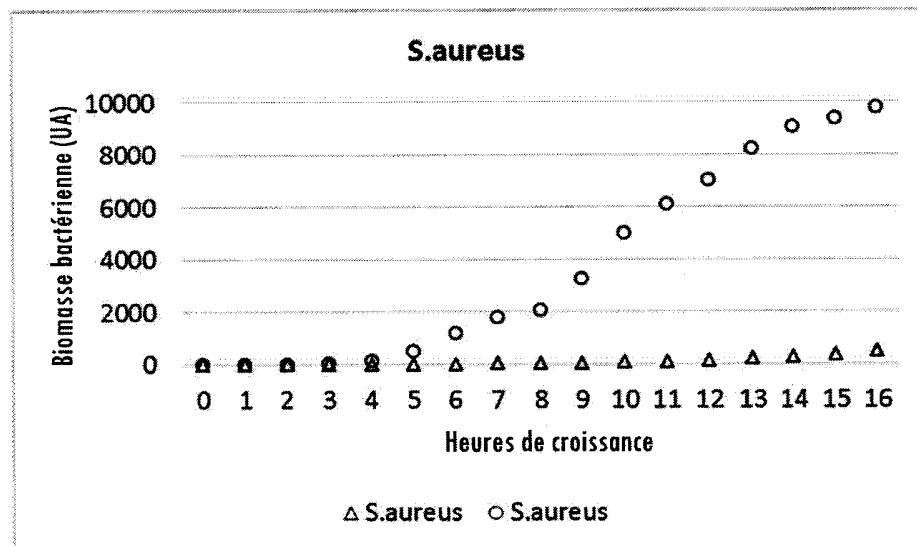


Figure 11c

