

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 351**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2019 PCT/US2019/065528**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2020 WO20123542**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2019 E 19832253 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 3894859**

54 Título: **Aparato y sistema autónomo para detectar microorganismos**

30 Prioridad:

10.12.2018 US 201862777473 P
30.01.2019 US 201962798980 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2024

73 Titular/es:

LABORATORY CORPORATION OF AMERICA HOLDINGS (100.0%)
358 South Main Street
Burlington, North Carolina 27215, US

72 Inventor/es:

HAHN, WENDY;
ANDERSON, DWIGHT LYMAN;
STACH, JESSICA;
ERICKSON, STEPHEN E.;
PAULSON, JOHN;
NGUYEN, MINH MINDY BAO y
GIL, JOSE S.

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 989 351 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aparato y sistema autónomo para detectar microorganismos

5 **Campo de la invención**

[0001] La invención se refiere a métodos, dispositivos y sistemas para la detección de microorganismos de interés utilizando bacteriófagos recombinantes.

10 **Antecedentes**

[0002] Existe un gran interés en mejorar la velocidad y la sensibilidad para la detección de bacterias, virus y otros microorganismos en muestras biológicas, alimentarias, de agua y clínicas. Los patógenos microbianos pueden causar una morbilidad sustancial entre los seres humanos y los animales domésticos, así como enormes pérdidas económicas. La detección de microorganismos es una alta prioridad para la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y para los Centros de Control de Enfermedades (CDC) debido a brotes de enfermedades potencialmente mortales o que causan la muerte por la ingestión de alimentos contaminados con ciertos microorganismos, por ejemplo, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* o *Salmonella spp.*

[0003] Las pruebas microbiológicas tradicionales para la detección de bacterias se basan en cultivos de enriquecimiento selectivo y no selectivo, seguidos de siembra en placas en medios selectivos y ensayos posteriores para confirmar colonias sospechosas. Tales procedimientos pueden requerir varios días. Se han investigado y puesto en práctica una variedad de métodos rápidos para reducir el tiempo requerido. Sin embargo, hasta la fecha, los métodos que reducen el requisito de tiempo tienen inconvenientes. Por ejemplo, las técnicas que implican inmunoensayos directos o sondas genéticas requieren de forma general una etapa de enriquecimiento durante la noche para obtener una sensibilidad adecuada y, por lo tanto, carecen de la capacidad de ofrecer resultados en el mismo día. Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también incluyen una etapa de amplificación y, por lo tanto, pueden tener una sensibilidad y selectividad muy altas; sin embargo, el tamaño de la muestra que puede someterse económicamente a los ensayos de PCR es limitado. Las suspensiones bacterianas diluidas capaces de someterse a PCR estarán libres de células y, por lo tanto, aún se requieren etapas de purificación y/o enriquecimiento prolongadas.

[0004] El tiempo requerido para el enriquecimiento biológico tradicional viene dictado por la velocidad de crecimiento de la población bacteriana diana de la muestra, por el efecto de la matriz de la muestra y por la sensibilidad requerida. En la práctica, la mayoría de los métodos de alta sensibilidad emplean una incubación durante la noche y requieren aproximadamente 24 horas en total. Debido al tiempo requerido para el cultivo, estos métodos pueden llevar hasta tres días, según el organismo que vaya a identificarse y la fuente de la muestra. De forma general, este tiempo de retraso no es adecuado, ya que permiten que los alimentos, el agua u otros productos contaminados lleguen al ganado o a los seres humanos. Además, el aumento de las bacterias resistentes a antibióticos y consideraciones de biodefensa hacen que la identificación rápida de patógenos bacterianos en el agua, en los alimentos y en las muestras clínicas sea una prioridad crítica en todo el mundo.

[0005] US2006/210968 describe el desarrollo de múltiples ensayos de detección bacteriana basados en un sistema de bacteriófagos T4, que utiliza mutaciones ámbar en los genes denA y denB. Smartt y col., Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 400, n.º 4, 2011, páginas 991 a 1007, describen la utilización de bacteriófagos para ensayos de diagnóstico basados en patrones de reconocimiento fago-hospedador. El documento US2015/218613 describe métodos para detectar células diana utilizando vectores diseñados que utilizan aparatos que tienen una carcasa y un actuador. Carriere y col., Journal of Clinical Microbiology, vol. 35, n.º 12, 1997, páginas 3232 a 3239, describe la generación de fagos con el objetivo de mejorar la actividad de luciferasa generada por la luciferasa TM4.

[0006] Por lo tanto, existe la necesidad de una detección e identificación más rápida, sencilla y sensible de microorganismos, tales como bacterias y otros microorganismos potencialmente patógenos.

55 **Resumen**

[0007] Las realizaciones de la invención comprenden dispositivos, composiciones, métodos y sistemas para la detección de microorganismos. La invención puede materializarse de diversas formas. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

[0008] Aspectos de la invención comprenden dispositivos para mejorar la facilidad y la simplicidad de la detección de microorganismos. En la presente memoria se describe un aparato o dispositivo para realizar un ensayo para detectar un microorganismo en una muestra de ensayo utilizando bacteriófagos recombinantes.

[0009] En un aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo que comprende un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante que tiene un constructo genético insertado en un genoma de bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen indicador; y un segundo compartimento

que comprende un componente de detección de señales, en donde el componente de detección de señales facilita la detección del producto del gen indicador producido como resultado de la infección de la muestra con el bacteriófago recombinante; en donde el dispositivo está exento de medio. En algunas realizaciones, el componente de detección de señales es un sustrato y el gen indicador codifica una enzima; y opcionalmente en donde la enzima es una luciferasa.

[0010] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para detectar uno o más microorganismos de interés en una muestra que comprende las etapas de poner en contacto la muestra con un reactivo infeccioso en un dispositivo, en donde uno o más microorganismos de interés en la muestra, si están presentes, son infectados por el agente infeccioso, en donde el dispositivo comprende un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante que tiene un constructo genético insertado en un genoma de bacteriófago, en donde el constructo comprende un promotor y un gen indicador; poner en contacto el bacteriófago recombinante del primer compartimento con la muestra de modo que el bacteriófago recombinante infecte uno o más microorganismos de la muestra, produciendo de este modo el producto del gen indicador y detectando el producto del gen indicador en un segundo compartimento; en donde el dispositivo está exento de medio.

[0011] La presente invención utiliza la alta especificidad de los bacteriófagos que pueden unirse a microorganismos para detectar niveles bajos de un microorganismo.

[0012] En algunas realizaciones, el segundo compartimento comprende un sustrato, y en donde la detección del producto del gen indicador se realiza después de poner en contacto el producto del gen indicador con un sustrato; o en donde el método comprende además unir los microorganismos de la muestra a un soporte sólido y, opcionalmente, en donde el soporte sólido es una perla, y/o en donde el soporte sólido comprende polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), ácido poliláctico (PLA) y cloruro de polivinilo (PVC).

[0013] En algunas realizaciones, el aparato comprende además un segundo compartimento que contiene un sustrato, y en donde el método comprende además añadir el sustrato del segundo compartimento a la muestra, simultáneamente con, o después de, añadir el bacteriófago recombinante; y/o en donde el primer compartimento comprende un sello, y en donde el bacteriófago recombinante con la muestra se pone en contacto con la muestra rompiendo el sello, en donde la rotura del sello hace que el bacteriófago recombinante del primer compartimento entre en contacto con la muestra e infecte uno o más microorganismos de la muestra, produciendo de este modo un producto del gen indicador.

[0014] En algunas realizaciones, el bacteriófago recombinante puede estabilizarse o conservarse. Por ejemplo, el bacteriófago recombinante puede estar liofilizado.

[0015] En algunas realizaciones, el aparato comprende un dispositivo de cierre para la mezcla por fases del bacteriófago recombinante y el sustrato con la muestra. En algunas realizaciones, el soporte sólido está seco antes de ponerse en contacto con la muestra.

[0016] En algunas realizaciones, la incubación es de 0 a 2 horas; y/o en donde el bacteriófago ha estado en contacto con la muestra durante 0,2-3 horas antes de detectar el producto del gen indicador; y/o la concentración de bacteriófago para la etapa de incubación es mayor que 1×10^5 UPF/ml, mayor que 1×10^6 UPF/ml, o mayor que 1×10^7 UPF/ml.

[0017] En algunas realizaciones, el producto del gen indicador comprende al menos uno de entre un fluoróforo, una proteína fluorescente, una partícula y una enzima; y opcionalmente en donde la enzima comprende al menos una de una luciferasa, una fosfatasa, una peroxidasa y una glucosidasa; y opcionalmente en donde la luciferasa es una luciferasa manipulada genéticamente.

[0018] En algunas realizaciones, el método detecta tan solo 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o una sola bacteria en una muestra de un tamaño estándar para la industria de la seguridad alimentaria; y/o en donde la muestra comprende carne o verduras; y/o en donde la muestra es una muestra de alimento, agua, productos lácteos, ambiental, comercial o clínica.

[0019] En algunas realizaciones, la muestra se incuba primero en condiciones que favorecen el crecimiento durante un período de enriquecimiento de 9 horas o menos, 8 horas o menos, 7 horas o menos, 6 horas o menos, 5 horas o menos, 4 horas o menos, 3 horas o menos, o 2 horas o menos.

[0020] En algunas realizaciones, la detección positiva del resto indicador requiere que la relación entre la señal y el fondo generado al detectar el resto indicador sea de al menos 2,0 o al menos 2,5.

[0021] El bacteriófago recombinante se modifica genéticamente para incluir un gen indicador como se ha descrito anteriormente. En realizaciones adicionales, el bacteriófago recombinante se deriva de un bacteriófago específico para el microorganismo a detectar. Por ejemplo, el bacteriófago recombinante puede derivarse de cualquiera de los siguientes bacteriófagos: Fago SPN1S de *Salmonella*, fago 10 de *Salmonella*, fago epsilon15 de *Salmonella*, fago

SEA1 de *Salmonella*, fago Spnls de *Salmonella*, fago P22 de *Salmonella*, fago LipZ5 de *Listeria*, fago P40 de *Listeria*, fago vB_LmoM_AG20 de *Listeria*, fago P70 de *Listeria*, fago A511 de *Listeria*, fago P4W de *Staphylococcus*, fago K de *Staphylococcus*, fago Twort de *Staphylococcus*, fago SA97 *Staphylococcus*, o fago O157:H7 CBA120 *Escherichia coli*.

5
 [0022] El indicador genera un resto indicador. En ciertas realizaciones, el resto indicador puede generar una señal intrínseca. En otras realizaciones, el resto indicador comprende una enzima que genera una señal tras la reacción con el sustrato. En otras realizaciones adicionales, el resto indicador comprende un cofactor que genera una señal tras la reacción con uno o más componentes productores de señales adicionales. Por ejemplo, el resto indicador
 10 comprende al menos uno de un fluoróforo, una proteína fluorescente, una partícula y una enzima. La enzima puede comprender al menos una de una luciferasa, una fosfatasa, una peroxidasa y una glucosidasa. El gen de la luciferasa puede ser un gen de origen natural, tal como la luciferasa de *Oplophorus*, la luciferasa de luciérnaga, la luciferasa *Lucia* o la luciferasa *Renilla*, o puede ser un gen modificado genéticamente.

15 [0023] La invención comprende un dispositivo o aparato para realizar el método de detección. En algunas realizaciones, un dispositivo puede incluir compartimentos separados. En algunas realizaciones, los compartimentos separados de un dispositivo están configurados para permitir al usuario combinar el contenido de diferentes compartimentos en diversas etapas del método de detección. La muestra a analizar se combina con un bacteriófago en un compartimento y se deja incubar durante un período de tiempo antes de añadirla al contenido de otro
 20 compartimento del dispositivo, tal como un sustrato. En tales casos, el sustrato puede reaccionar con cualquier resto indicador producido como resultado de la infección por el bacteriófago recombinante (por ejemplo, si el microorganismo diana está presente en la muestra).

25 [0024] En algunas realizaciones, el aparato comprende un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante, una entrada/portal para añadir una parte de una muestra de ensayo al bacteriófago recombinante y un segundo compartimento que comprende un sustrato u otro reactivo emparejado y en donde el método comprende además añadir el sustrato del segundo compartimento a la muestra, de forma simultánea o después de añadir el bacteriófago recombinante. En algunas realizaciones, donde el aparato comprende un tercer compartimento, el
 30 aparato está exento de medio.

[0025] En algunas realizaciones, el aparato comprende además un segundo compartimento que comprende un sustrato, y en donde la detección del producto del gen indicador se realiza poniendo en contacto el producto del gen indicador con un sustrato. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una perla. En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), ácido poliláctico (PLA) y cloruro de polivinilo (PVC). En algunas realizaciones, el soporte sólido está seco antes de ponerse en contacto con la muestra.
 35

[0026] En algunas realizaciones, el soporte sólido está recubierto con un componente de unión a células que se une con alta afinidad al microorganismo de interés en la muestra. Esto permite que más bacterias se unan al soporte sólido y aumenta la sensibilidad y especificidad del ensayo. En otras realizaciones, el soporte sólido se recubre con un anticuerpo capaz de unirse al microorganismo de interés.
 40

[0027] En algunas realizaciones, el primer compartimento comprende un sello, y en donde el bacteriófago recombinante con la muestra se pone en contacto con la muestra rompiendo el sello, en donde la rotura del sello hace que el bacteriófago recombinante del primer compartimento entre en contacto con la muestra e infecte uno o
 45 más microorganismos de la muestra, produciendo de este modo un producto del gen indicador (proteína indicadora). En otras realizaciones, el aparato comprende un dispositivo de cierre para la mezcla por fases del bacteriófago recombinante y el sustrato con la muestra.

[0028] Otras realizaciones incluyen sistemas para detectar microorganismos tales como *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* o *E. coli* O157:H7, que comprenden un bacteriófago recombinante. Algunas realizaciones incluyen además un sustrato para reaccionar con un resto indicador del bacteriófago recombinante. Estos sistemas pueden incluir las características descritas para el bacteriófago, las composiciones y los métodos de la invención.
 50

[0029] El sistema para detectar microorganismos de interés en una muestra que comprende: un aparato, que comprende: un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante que tiene un constructo genético insertado en un genoma de bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen
 55 indicador; y un componente de detección de señales, en donde el componente de detección de señales puede detectar el producto del gen indicador producido al infectar la muestra con el bacteriófago recombinante, en donde el dispositivo está exento de medio. En algunas realizaciones, el componente de detección de señales es un luminómetro portátil.
 60

Breve descripción de las figuras

[0030] La presente invención puede entenderse mejor haciendo referencia a las siguientes Figuras no limitativas.
 65

La **Figura 1** muestra una realización de un método para detectar una bacteria de interés utilizando un bacteriófago recombinante.

La **Figura 2** muestra los resultados de la detección del cultivo de *L. monocytogenes* utilizando una realización de un aparato autónomo con un hisopo como soporte sólido. Las señales correspondientes a la presencia de la bacteria se detectaron mediante luminómetros Hygiena, GloMax y GloMax 20/20. La Tabla 1 muestra los resultados del cultivo en fase logarítmica y la tabla 2 muestra los resultados del cultivo durante la noche.

Las **Figuras 3A y 3B** son gráficos generados a partir de los datos mostrados en la Tabla 1. La **Figura 3A** muestra las mediciones de las señales detectadas utilizando Hygiena. Los hisopos se inocularon con células en fase logarítmica al nivel de UFC indicado. La muestra se infectó inmediatamente con el cóctel de fagos de *Listeria* durante 4 horas. Se añadió sustrato y las muestras se leyeron en el luminómetro Hygiena. Una señal de >10 ULR se considera positiva. Con este método, se requieren aproximadamente 25.000 UFC para generar un resultado positivo.

La **Figura 3B** muestra las mediciones de las señales detectadas utilizando los luminómetros GloMax 20/20 y GloMax (también conocido como GloMax 96). Los hisopos se inocularon con células en fase logarítmica al nivel de UFC indicado. La muestra se infectó inmediatamente con el cóctel de fagos de *Listeria* durante 4 horas. Se añadió sustrato y las muestras se leyeron en los luminómetros GloMax 20/20 (1 ml de muestra) o GloMax (150 pl de muestra). Una relación señal/fondo >3,0 se considera positiva. Con este método, se requieren aproximadamente 5.000 UFC para generar un resultado positivo.

La **Figura 4** muestra los resultados de la detección de *Salmonella* en carne de pavo molida que ha sido inoculada con *Salmonella*. La Tabla 3 muestra la muestra de control no inoculada y la Tabla 4 muestra la muestra de pavo inoculado. Las pruebas se repitieron con tiempos de incubación e infección variables.

La **Figura 5A y la Figura 5B** son gráficos generados a partir de los datos de la **Figura 4**. La **Figura 6A** muestra que las muestras de pavo inoculadas con *Salmonella* se detectaron como positivas con cada tiempo de incubación e infección analizado. La muestra de pavo se cultivó durante 24 horas a 41 °C después de la inoculación antes de ensayarla con los métodos descritos en la solicitud. Para la señal relativa: 0 horas de incubación, 2 horas de infección > 1 hora de incubación, 0,5 horas de infección > 0 horas de incubación, 0,5 horas de infección. Además, la comparación de la señal ULR muestra que los luminómetros GloMax tienen una señal mucho más alta que la del luminómetro Hygiena.

La **Figura 5B** muestra que la detección utilizando los luminómetros GloMax 20/20 y GloMax produjo relaciones señal/fondo similares para las mismas muestras. Aunque GloMax 20/20 tenía una señal mayor (**Figura 5A**), el fondo era significativamente más alto que el del GloMax. Por lo tanto, al determinar la señal/fondo, los dos luminómetros funcionan de forma similar.

La **Figura 6** muestra datos para detectar *Salmonella* en tres muestras de pavo (muestras 21, 24 y 26) que habían sido inoculadas con *Salmonella* antes de los ensayos utilizando el aparato autónomo. Las muestras se infectaron durante un período de tiempo diferente, tal como se indica antes de la detección de la señal.

Las **Figuras 7A-7C** son gráficos generados a partir de los datos mostrados en la **Figura 6**. Las **Figuras 7A-7C** muestran los resultados de los experimentos en los que se enriquecieron tres muestras de carne de pavo triturada inoculadas durante 24 horas y se tomaron muestras con hisopos y se ensayaron. Las muestras 24 (**Figura 7B**) y 26 (**Figura 7C**) no mostraron señal en el luminómetro portátil Hygiena para las muestras que tenían una infección por fagos durante 30 minutos, pero sí para la muestra que tenía una infección de 2 horas. Los luminómetros GloMax 20/20 y GloMax generaron señales relativamente bajas.

Las **Figuras 8A-8C** son gráficos generados a partir de los datos mostrados en la **Figura 6**. Los gráficos muestran que tanto GloMax 20/20 como GloMax pudieron detectar la Muestra 21 (**Figura 8A**) y 26 (**Figura 8B**) como positivas con una infección de 30 minutos (una relación señal/fondo de > 3,0 es positiva), sin embargo la Muestra 24 (**Figura 8C**) requirió una infección de 2 horas para mostrar un resultado positivo. Los resultados de los luminómetros GloMax 20/20 y GloMax fueron similares.

La **Figura 9** muestra datos para detectar muestras de esponja ambientales de *L. monocytogenes* de superficies inoculadas y enriquecidas durante 24 horas.

La **Figura 10** muestra la detección de microorganismos en muestras de pavo inoculadas con *Salmonella* utilizando el aparato. Las señales se midieron utilizando tres luminómetros diferentes: GloMax, 3M e Hygiena.

Las **Figuras 11A, 11B y 11C** muestran una vista de una realización de un sistema de aparato autónomo para detectar microorganismos, que tiene un hisopo (**Figura 11A**) o una perla (**Figura 11B**) insertada en un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada compartimento está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento contiene fagos, el segundo compartimento contiene sustrato y el tercer compartimento contiene

medios. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un hisopo. En algunas realizaciones, el dispositivo está exento de medio (**Figura 11C**).

5 **Las Figuras 12A, 12B y 12C** muestran una vista de una realización de un sistema de aparato autónomo para detectar microorganismos, que tiene un hisopo (**Figura 12A**) o una perla (**Figura 12B**) insertada en un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada compartimento está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento contiene fagos, el segundo compartimento contiene medios y el tercer compartimento contiene sustrato. Tras la incubación con el fago y el medio, puede romperse el sello que separa el segundo y el tercer compartimento. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un hisopo. En algunas realizaciones, el dispositivo está exento de medio (**Figura 12C**).

15 **Las Figuras 13A, 13B y 13C** muestran una vista de una realización de un sistema de aparato autónomo para detectar microorganismos, que tiene un hisopo (**Figura 13A**) o una perla (**Figura 13B**) insertada en un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada compartimento está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento contiene medios, el segundo compartimento contiene fagos y el tercer compartimento contiene sustrato. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un hisopo. En algunas realizaciones, el dispositivo está exento de medio (**Figura 13C**).

20 **Las Figuras 14A, 14B y 14C** muestran una vista de una realización de un sistema de aparato autónomo para detectar microorganismos, que tiene un hisopo (**Figura 14A**) o una perla (**Figura 14B**) insertada en un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada compartimento está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento contiene medios, el segundo compartimento contiene fagos y el tercer compartimento contiene sustrato. El aparato tiene un mecanismo de bloqueo para mezclar los reactivos por fases. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un hisopo. En algunas realizaciones, el dispositivo está exento de medio (**Figura 14C**).

25 **Las Figuras 15A, 15B y 15C** muestran una vista de una realización de un sistema de aparato autónomo para detectar microorganismos, que tiene un hisopo (**Figura 15A**) o una perla (**Figura 15B**) insertado en un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada compartimento está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento contiene medios, el segundo compartimento contiene fagos y el tercer compartimento contiene sustrato. El aparato tiene un mecanismo de bloqueo para mezclar los reactivos por fases. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un hisopo. En algunas realizaciones, el dispositivo está exento de medio (**Figura 15C**).

35 **La Figura 16** representa una vista de un ejemplo de un sistema de aparato autónomo para un sistema de detección de microorganismos, que tiene un hisopo insertado en un recipiente que comprende dos compartimentos. Cada compartimento está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento contiene fagos y el segundo compartimento contiene sustrato. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un hisopo.

40 **La Figura 17** representa un diagrama de flujo de una realización que utiliza un sistema de aparatos autónomo para detectar microorganismos.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

45 **[0031]** A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto exija lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. De forma general, las nomenclaturas utilizadas en relación con el cultivo de células y tejidos, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Los métodos y técnicas conocidos se llevan a cabo de forma general según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo según las especificaciones del fabricante, tal como se logra habitualmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las nomenclaturas utilizadas en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio descritos en la presente memoria son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.

60 **[0032]** Se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

[0033] Como se utilizan en la presente memoria, los términos “un”, “una” y “el/la” pueden referirse a uno o más a menos que se indique específicamente lo contrario.

65 **[0034]** El uso del término “o” se utiliza para significar “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción respalde una definición

que se refiera solo a alternativas y “y/o”. Como se utiliza en la presente memoria, “otro” puede significar al menos un segundo o más.

5 **[0035]** En esta solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método empleado para determinar el valor o la variación que existe entre muestras.

10 **[0036]** El término “soporte sólido” o “soporte” significa una estructura que proporciona un sustrato y/o una superficie sobre la que pueden unirse las biomoléculas. Por ejemplo, un soporte sólido puede ser un pocillo de ensayo (es decir, tal como una placa de microtitulación o una placa multipocillo), o el soporte sólido puede ser un lugar en un filtro, una matriz o un soporte móvil, tal como una perla o una membrana (por ejemplo, una placa de filtro o una tira de flujo lateral).

15 **[0037]** El término “indicador” o “resto indicador” o “resto detectable” o “biomolécula detectable” o “marcador” o “marca” se refiere a una molécula que proporciona una señal que puede medirse en un ensayo cualitativo o cuantitativo. Por ejemplo, un resto indicador puede comprender una enzima que puede utilizarse para convertir un sustrato en un producto que pueda medirse. Un resto indicador puede ser una enzima que cataliza una reacción que genera emisiones bioluminiscentes (por ejemplo, luciferasa, HRP o AP). O bien, un resto indicador puede ser un radioisótopo que pueda cuantificarse. O bien, un resto indicador puede ser un fluoróforo. O pueden utilizarse otras moléculas detectables.

20 **[0038]** Como se utiliza en la presente memoria, “bacteriófago” o “fago” incluye uno o más de una pluralidad de virus bacterianos. En esta descripción, los términos “bacteriófago” y “fago” incluyen virus tales como micobacteriófagos (tales como para el bacilo de la tuberculosis y de la paratuberculosis), micófagos (tales como para hongos), fagos de micoplasma y cualquier otro término que se refiera a un virus que puede invadir bacterias, hongos, micoplasmas, protozoos, levaduras y otros organismos vivos microscópicos vivos y que los utiliza para autorreplicarse. Aquí, “microscópico” significa que la dimensión más grande es un milímetro o menos. Los bacteriófagos son virus que han evolucionado en la naturaleza para utilizar las bacterias como medio para replicarse.

25 **[0039]** Como se utiliza en la presente memoria, “enriquecimiento de cultivos”, “cultivado para enriquecimiento” o “cultivo para enriquecimiento” se refiere al cultivo tradicional, como la incubación en medios favorables a la propagación de microorganismos, y no debe confundirse con otros posibles usos de la palabra “enriquecimiento”, como el enriquecimiento mediante la eliminación del componente líquido de una muestra para concentrar el microorganismo que contiene, u otras formas de enriquecimiento que no incluyen la facilitación tradicional de la propagación de microorganismos. Cultivar para enriquecimiento durante períodos cortos de tiempo puede emplearse en algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, pero no es necesario y es durante un período de tiempo mucho más corto que el cultivo tradicional para enriquecimiento, si es que se utiliza.

30 **[0040]** Como se utiliza en la presente memoria, “recombinante” se refiere a las modificaciones genéticas (es decir, de ácidos nucleicos) que se realizan normalmente en un laboratorio para reunir material genético que de otro modo no se encontraría. Este término se utiliza indistintamente con el término “modificado” en la presente memoria.

35 **[0041]** Como se utiliza en la presente memoria, “ULR” se refiere a unidades de luz relativas medidas con un luminómetro (por ejemplo, el GLOMAX[®] 96) o un instrumento similar que detecta la luz. Por ejemplo, la detección de la reacción entre la luciferasa y el sustrato apropiado (por ejemplo, NANOLUC[®] con NANO-GLO[®]) se comunica a menudo en ULR detectadas.

40 Visión general

45 **[0042]** La presente invención utiliza la alta especificidad de los bacteriófagos recombinantes que pueden unirse a un microorganismo particular con alta afinidad para detectar la presencia y/o cuantificar el microorganismo específico en la muestra.

50 **[0043]** En la presente memoria se describen composiciones, métodos y sistemas, como se definen en las reivindicaciones adjuntas, que demuestran una sensibilidad y una velocidad sorprendentes para la detección de un microorganismo de interés en las muestras de ensayo (por ejemplo, muestras de alimentos, agua, productos lácteos, ambientales, comerciales, clínicas u otras muestras biológicas) mediante ensayos realizados sin cultivo para el enriquecimiento o, en algunas realizaciones, con tiempos de incubación mínimos durante los cuales el microorganismo podría multiplicarse potencialmente. Estas composiciones, métodos y sistemas permiten lograr la detección de microorganismos en un período de tiempo más corto de lo que se creía posible anteriormente.

55 **[0044]** Algunas realizaciones de las composiciones, métodos y sistemas de la invención pueden aplicarse a la detección de una variedad de microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras) en una variedad de circunstancias, que incluyen, aunque no de forma limitativa, la detección de patógenos en muestras de alimentos, agua, productos lácteos, ambientales, comerciales, clínicas u otras muestras biológicas. Las realizaciones de

5 detección basadas en bacteriófagos recombinantes descritas en la presente memoria pueden adaptarse a cualquier bacteria u otro microorganismo de interés (por ejemplo, microorganismos patógenos) para el que esté disponible un bacteriófago específico que no reconozca los microorganismos para los que la detección no es de interés. Los métodos de la presente invención proporcionan una alta sensibilidad y especificidad de detección rápidamente y sin la necesidad de un enriquecimiento biológico tradicional (por ejemplo, cultivo). Por lo tanto, puede detectarse una variedad de microorganismos utilizando los métodos de la invención.

10 **[0045]** Las realizaciones de los métodos y sistemas de la invención pueden aplicarse a la detección y cuantificación de una variedad de microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras) en una variedad de circunstancias, que incluyen, entre otras, la detección de patógenos en muestras de alimentos, agua, productos lácteos, ambientales, comerciales, clínicas u otras muestras biológicas. Los métodos de la presente invención pueden proporcionar rápidamente una alta sensibilidad y especificidad de detección sin la necesidad de un enriquecimiento biológico tradicional (por ejemplo, cultivo), lo que es un aspecto sorprendente, ya que todos los métodos disponibles con la sensibilidad y especificidad deseadas requieren cultivo.

15 **[0046]** También se describen en la presente memoria sistemas y métodos que utilizan un aparato para detectar microorganismos en muestras de prueba (por ejemplo, muestras de alimentos, agua, productos lácteos, ambientales, comerciales, clínicas u otras muestras biológicas). El método utiliza un aparato autónomo que puede comprender un soporte sólido, que puede utilizarse para recolectar muestras. El aparato comprende un primer compartimento que comprende un bacteriófago que tiene un constructo genético insertado en el genoma del bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen indicador. El método comprende poner en contacto el bacteriófago recombinante del primer compartimento con la muestra de forma que el bacteriófago recombinante infecte uno o más microorganismos de la muestra produciendo de este modo un producto del gen indicador (“indicador”) y detectando el indicador. El aparato comprende además un segundo compartimento, que contiene un sustrato específico para detectar el indicador. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la muestra que ha sido infectada por el bacteriófago con el sustrato, detectándose de este modo el indicador. En estas realizaciones, cada compartimento puede separarse del compartimento inmediatamente adyacente mediante un sello de acción rápida que, al romperse, permite que el contenido de los compartimentos salga del compartimento y se mezcle con el contenido de la muestra o con el contenido de otros compartimentos. Por ejemplo, un usuario puede romper el sello de acción rápida de modo que el bacteriófago recombinante del primer compartimento entre en contacto con la muestra sobre el soporte sólido, infectando de este modo los microorganismos que se unen al mismo. Tras la infección de los microorganismos, el gen indicador se expresa para producir una proteína indicadora, que puede detectarse mediante diversos dispositivos de detección. La presencia de las señales indica la presencia de los microorganismos en la muestra.

20 **[0047]** Algunas realizaciones del aparato, los métodos y el sistema de la invención pueden aplicarse a la detección de una variedad de microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras) en una variedad de circunstancias, que incluyen, aunque no de forma limitativa, la detección de patógenos en muestras de alimentos, agua, productos lácteos, ambientales, comerciales, clínicas u otras muestras biológicas. Las realizaciones de detección descritas en la presente memoria pueden adaptarse a cualquier bacteria u otro microorganismo de interés (por ejemplo, microorganismos patógenos) para los que haya disponible un bacteriófago recombinante específico que no reconozca otros microorganismos que no sean de interés. Los métodos de la presente invención proporcionan una alta sensibilidad y especificidad de detección rápidamente y sin la necesidad de un enriquecimiento biológico tradicional (por ejemplo, cultivo). Este es un aspecto sorprendente, ya que todos los métodos disponibles con la sensibilidad y especificidad deseadas requieren cultivo. La detección de microorganismos en una muestra utilizando el aparato autónomo, que aloja los reactivos necesarios para detectar el microorganismo en compartimentos separados hasta el momento de la detección, es conveniente y eficiente. El aparato es fácil de utilizar y no requiere una amplia formación.

50 Muestras

[0048] Cada una de las realizaciones de los métodos y sistemas de la invención permite la rápida detección y/o cuantificación de los microbios en una muestra. Por ejemplo, los métodos según la presente invención pueden realizarse en un período de tiempo reducido con resultados superiores.

55 **[0049]** En algunas realizaciones de la invención, se utiliza un bacteriófago recombinante para detectar microorganismos de interés. Los microorganismos que pueden detectarse mediante los métodos y sistemas de la presente invención incluyen patógenos que sean de interés comercial, médico o veterinario. Cualquier microorganismo para el que se haya identificado un bacteriófago recombinante específico para el microbio particular puede detectarse mediante los métodos de la presente invención. Los expertos en la técnica apreciarán que no hay límite para la aplicación de los presentes métodos aparte de la disponibilidad de los pares bacteriófago/microbio recombinantes necesarios.

60 **[0050]** Las células bacterianas detectables por la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, células bacterianas que son patógenos transmitidos por los alimentos o el agua. Las células bacterianas detectables por la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, todas las especies de *Salmonella*, todas las cepas

de *Escherichia coli*, incluyendo, pero no limitándose a *E. coli* O157:H7 (y otras cepas productoras de toxina Shiga y enterotoxina de *E. coli*), todas las especies de *Listeria*, incluyendo, aunque no de forma limitativa, *L. monocytogenes*, y todas las especies de *Campylobacter*. Las células bacterianas detectables por la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, células bacterianas que son patógenos de importancia médica o veterinaria. Tales patógenos incluyen, aunque no de forma limitativa, *Bacillus spp.*, *Bordetella pertussis*, *Brucella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Yersinia spp.*, *Vibrio spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp.*

[0051] La muestra puede ser una muestra ambiental o de comida o de agua. Algunas realizaciones pueden incluir muestras médicas o veterinarias. Las muestras pueden ser líquidas, sólidas o semisólidas. Las muestras pueden ser hisopos de superficies sólidas. Las muestras pueden incluir materiales ambientales, tal como muestras de agua, o los filtros de muestras de aire, o muestras de aerosoles de colectores ciclónicos. Las muestras pueden ser de carne de vacuno, aves de corral, alimentos procesados, leche, queso u otros productos lácteos. Las muestras médicas o veterinarias incluyen, aunque no de forma limitativa, muestras de sangre, esputo, líquido cefalorraquídeo y heces. En algunas realizaciones, las muestras pueden ser diferentes tipos de hisopos.

[0052] En algunas realizaciones, las muestras pueden utilizarse directamente en los métodos de detección de la presente invención, sin preparación, concentración o dilución. Por ejemplo, las muestras líquidas, que incluyen, aunque no de forma limitativa, leche y zumos, pueden analizarse directamente. En otras realizaciones, las muestras pueden diluirse o suspenderse en solución, que puede incluir, aunque no de forma limitativa, una solución tamponada o un medio de cultivo bacteriano. Una muestra que sea sólida o semisólida puede suspenderse en un líquido picando, mezclando o macerando el sólido en el líquido. En algunas realizaciones, una muestra debe mantenerse dentro de un intervalo de pH que promueva la unión del bacteriófago recombinante a la célula bacteriana huésped. En algunas realizaciones, el intervalo de pH preferido puede ser uno adecuado para el bacteriófago unido a una célula bacteriana. Una muestra también debe contener las concentraciones apropiadas de cationes divalentes y monovalentes, incluyendo aunque no de forma limitativa Na^+ , Mg^{2+} y K^+ .

[0053] En algunas realizaciones, la muestra se mantiene a una temperatura que mantiene la viabilidad de cualquier célula patógena presente en la muestra. Durante las etapas en las que los bacteriófagos se unen a las células bacterianas, la muestra puede mantenerse a una temperatura que facilite la actividad de los bacteriófagos. Dichas temperaturas son de al menos aproximadamente 25 °C y no más de aproximadamente 45 °C. En algunas realizaciones, la muestra se mantiene a unos 37 °C. En algunas realizaciones, las muestras se someten a una mezcla o agitación suave durante la unión o infección de los bacteriófagos recombinantes.

Métodos de uso de bacteriófagos recombinantes para detectar microorganismos

[0054] Se han descrito previamente métodos para utilizar bacteriófagos recombinantes para detectar microorganismos de interés. Los ensayos pueden incluir varias muestras de control apropiadas. Por ejemplo, las muestras de control que no contienen bacteriófagos recombinantes y/o las muestras de control que contienen bacteriófagos recombinantes sin bacterias pueden ensayarse como controles para determinar los niveles de señal de fondo.

[0055] Como se indica en la presente memoria, en ciertas realizaciones, la invención puede comprender métodos de uso de bacteriófagos recombinantes para detectar microorganismos como se definen en las reivindicaciones. Los métodos de la invención pueden realizarse de diversas formas.

[0056] En algunos aspectos, la invención comprende un método para detectar un microorganismo de interés como se define en las reivindicaciones. El método utiliza un bacteriófago recombinante para la detección del microorganismo de interés. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el microorganismo de interés es una bacteria y el bacteriófago recombinante se deriva de un bacteriófago que reconoce específicamente la bacteria de interés. En ciertas realizaciones, el método puede comprender la detección de una bacteria de interés en una muestra incubando la muestra con una pluralidad de bacteriófagos recombinantes que pueden unirse a la bacteria de interés. Una pluralidad de bacteriófagos recombinantes unidos a un solo microorganismo es cualquier número mayor que 1, pero es preferiblemente al menos 5×10^4 , o al menos 1×10^5 , o al menos 1×10^6 , o al menos 1×10^7 , o al menos 1×10^{10} bacteriófagos recombinantes.

[0057] El bacteriófago recombinante comprende un resto indicador. Los métodos pueden comprender detectar el resto indicador del bacteriófago recombinante, en donde la detección positiva del resto indicador indica que la bacteria de interés está presente en la muestra.

[0058] La invención comprende un método para detectar tan solo un microorganismo de interés en una muestra, que comprende las etapas de: incubar la muestra con una pluralidad de bacteriófagos recombinantes que se unen al microorganismo de interés, en donde el bacteriófago recombinante tiene un constructo genético insertado en el genoma del bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen indicador, y se pone en contacto con la muestra a ensayar en condiciones tales que la pluralidad de bacteriófagos recombinantes se unen a

bacteria de interés que produce de este modo producto del gen indicador; separar el bacteriófago recombinante no unido del bacteriófago recombinante unido a células; y detectar el resto indicador resultante de la infección de la bacteria, en donde la detección positiva del producto del gen indicador, en un segundo compartimento en donde el dispositivo está exento de medio, indica que el microorganismo de interés está presente en la muestra. Las realizaciones pueden incluir incubar la muestra con al menos 5×10^8 , o al menos 5×10^9 , o al menos 5×10^{10} , o al menos 5×10^{11} , o al menos 5×10^{12} , o al menos 5×10^{13} bacteriófagos recombinantes.

[0059] En algunas realizaciones, la etapa de detección requerirá la adición de un sustrato sobre el que actúe la enzima indicadora. La selección de un indicador particular no es crítica para la presente invención, pero el indicador será capaz de generar una señal detectable por sí mismo, o ser detectable instrumentalmente, o ser detectable junto con uno o más componentes productores de señales adicionales, tales como un sistema productor de señales de enzima/sustrato.

[0060] En ciertas realizaciones, el ensayo puede realizarse para utilizar un bacteriófago recombinante para identificar la presencia de un microorganismo específico. El ensayo puede modificarse para adaptarse a diferentes tipos o tamaños de muestras y formatos de ensayo. Las realizaciones que emplean el bacteriófago recombinante de la invención pueden permitir la detección rápida de cepas bacterianas específicas, con tiempos totales de ensayo inferiores a 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5 o 12 horas, según el tipo de muestra, el tamaño de la muestra y el formato de ensayo. Por ejemplo, la cantidad de tiempo requerida puede ser algo más corta o más larga dependiendo de la afinidad del bacteriófago recombinante y/o de los tipos de bacterias que se detecten en el ensayo, del tipo y tamaño de la muestra a analizar, de la complejidad del entorno físico/químico y de la concentración de contaminantes bacterianos endógenos no diana.

[0061] La Figura 1 ilustra una realización de un ensayo para detectar una bacteria de interés utilizando un bacteriófago recombinante según una realización de la invención. Es posible una amplia variedad de configuraciones y etapas para combinar reactivos. En la realización ilustrada aquí, las alícuotas del fago indicador (o fago indicador liofilizado) están contenidas en un primer compartimento de un dispositivo. Se introduce un hisopo que contiene bacterias en el primer compartimento y se incuba durante un período de tiempo (por ejemplo, 45 minutos a 37°C) suficiente para que el fago se replique y genere un indicador soluble (por ejemplo, luciferasa). El sello entre el primer compartimento que contiene el indicador soluble y el fago y un segundo compartimento puede romperse entonces para permitir que la proteína indicadora soluble entre en contacto con un sustrato contenido dentro del segundo compartimento. Puede utilizarse un luminómetro para detectar la reacción del indicador (por ejemplo, la luciferasa) con un sustrato. Los experimentos que utilizan este método se describen en la presente memoria. En algunas realizaciones, después de la infección, el contenido del dispositivo puede volver al primer compartimento para mezclar las bacterias infectadas con el sustrato. En otras realizaciones, el contenido puede entonces ser empujado de nuevo al segundo compartimento de modo que la señal indicadora pueda leerse en el luminómetro.

[0062] En algunas realizaciones, la muestra puede enriquecerse antes de analizarla mediante incubación en condiciones que favorezcan el crecimiento. En tales casos, el período de enriquecimiento puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o hasta 8 horas o más, dependiendo del tipo y tamaño de la muestra. En algunas realizaciones, la muestra no se enriquece antes de la incubación con bacteriófagos recombinantes.

[0063] Por lo tanto, el bacteriófago indicador comprende un resto indicador detectable, y la infección de una sola célula patógena (por ejemplo, una bacteria) puede detectarse mediante una señal amplificada generada a través del resto indicador. Por lo tanto, el método comprende detectar un resto indicador producido durante la replicación del fago, en donde la detección del indicador indica que la bacteria de interés está presente en la muestra.

[0064] Como se describe con más detalle en la presente memoria, los métodos y sistemas de la invención pueden utilizar un intervalo de concentraciones de bacteriófagos indicadores parentales para infectar las bacterias presentes en la muestra. En algunas realizaciones, los bacteriófagos indicadores se añaden a la muestra a una concentración suficiente para encontrar, unirse e infectar rápidamente las bacterias diana que están presentes en cantidades muy bajas en la muestra, tal como una sola célula. En algunas realizaciones, la concentración de fagos puede ser suficiente para encontrar, unir e infectar la bacteria diana en menos de una hora. En otras realizaciones, estos acontecimientos pueden producirse en menos de dos horas, o menos de tres horas, después de la adición del fago indicador a la muestra. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la concentración de bacteriófagos para la etapa de incubación es mayor de 1×10^5 UPF/ml, mayor de 1×10^6 UPF/ml, o mayor de 1×10^7 UPF/ml.

[0065] Los métodos de la invención pueden comprender varias otras etapas para aumentar la sensibilidad. Por ejemplo, como se describe con más detalle en la presente memoria, el método puede comprender una etapa para capturar y lavar la bacteria capturada y unida, para eliminar el exceso de bacteriófagos recombinantes y aumentar la relación señal/ruido. En algunas realizaciones, la detección positiva del resto indicador requiere que la relación entre la señal y el fondo generado al detectar el resto indicador sea de al menos 2,0 o al menos 2,5.

[0066] Las Figuras 2-10 muestran datos y gráficos de esos datos procedentes de realizaciones ilustrativas de ensayos con bacteriófagos recombinantes.

[0067] Las Figuras 2, 3A y 3B se refieren a la detección de *L. monocytogenes*. La Figura 2 muestra los datos de la detección del cultivo de *L. monocytogenes* utilizando una realización de un aparato autónomo con un hisopo como soporte sólido. Las señales correspondientes a la presencia de la bacteria se detectaron mediante luminómetros Hygiena, GloMax y GloMax 20/20. La Tabla 1 muestra los resultados del cultivo en fase logarítmica y la Tabla 2 muestra los resultados del cultivo durante la noche.

[0068] Las Figuras 3A y 3B son gráficos generados a partir de los datos mostrados en la Tabla 1. La Figura 3A muestra las mediciones de las señales detectadas utilizando Hygiena. Los hisopos se inocularon con células en fase logarítmica al nivel de UFC indicado. La muestra se infectó inmediatamente con el cóctel de fagos de *Listeria* durante 4 horas. Se añadió sustrato y las muestras se leyeron en el luminómetro Hygiena. Una señal de >10 ULR se considera positiva. Con este método, se requieren aproximadamente 25.000 UFC para generar un resultado positivo.

[0069] La Figura 3B muestra las mediciones de las señales detectadas utilizando los luminómetros GloMax 20/20 y GloMax (también conocido como GloMax 96). Los hisopos se inocularon con células en fase logarítmica al nivel de UFC indicado. La muestra se infectó inmediatamente con el cóctel de fagos de *Listeria* durante 4 horas. Se añadió sustrato y las muestras se leyeron en los luminómetros GloMax 20/20 (1 ml de muestra) o GloMax (150 pl de muestra). Una relación señal/fondo >3,0 se considera positiva. Con este método, se requieren aproximadamente 5.000 UFC para generar un resultado positivo.

[0070] Las Figuras 4-8 se refieren a realizaciones que demuestran la detección de *Salmonella*. La Figura 4 muestra los resultados de la detección de *Salmonella* en carne de pavo molida que ha sido inoculada con *Salmonella*. La Tabla 3 muestra la muestra de control no inoculada y la Tabla 4 muestra la muestra de pavo inoculada. Los ensayos se repitieron con tiempos de incubación e infección variables.

[0071] La Figura 5A y la Figura 5B son gráficos generados a partir de los datos de la Figura 4. La Figura 6A muestra que las muestras de pavo inoculadas con *Salmonella* se detectaron como positivas con cada tiempo de incubación e infección analizado. La muestra de pavo se cultivó durante 24 horas a 41 °C después de la inoculación antes de ensayarla con los métodos descritos en la solicitud. Para la señal relativa: 0 horas de incubación, 2 horas de infección > 1 hora de incubación, 0,5 horas de infección > 0 horas de incubación, 0,5 horas de infección. Además, la comparación de la señal ULR muestra que los luminómetros GloMax tienen una señal mucho más alta que la del luminómetro Hygiena.

[0072] La Figura 5B muestra que la detección utilizando los luminómetros GloMax 20/20 y GloMax produjo relaciones señal/fondo similares para las mismas muestras. Aunque GloMax 20/20 tenía una señal mayor (Figura 5A), el fondo era significativamente más alto que el del GloMax. Por lo tanto, al determinar la señal/fondo, los dos luminómetros funcionan de forma similar.

[0073] La Figura 6 muestra datos para detectar *Salmonella* en tres muestras de pavo (muestras 21, 24 y 26) que habían sido inoculadas con *Salmonella* antes de los ensayos utilizando el aparato autónomo. Las muestras se infectaron durante un período de tiempo diferente, como se indica antes de la detección de la señal.

[0074] Las Figuras 7A-7C son gráficos generados a partir de los datos mostrados en la Figura 6. Las Figuras 7A-7C muestran los resultados de los experimentos en los que se enriquecieron tres muestras de carne de pavo triturada inoculadas durante 24 horas y se tomaron muestras con hisopos y se ensayaron. Las muestras 24 (Figura 7B) y 26 (Figura 7C) no mostraron señal en el luminómetro portátil Hygiena para las muestras que tenían una infección por fagos de 30 minutos, pero sí para la muestra que tenía una infección de 2 horas. Los luminómetros GloMax 20/20 y GloMax generaron señales relativamente bajas.

[0075] Las Figuras 8A-8C son gráficos generados a partir de los datos mostrados en la Figura 6. Los gráficos muestran que tanto GloMax 20/20 como GloMax pudieron detectar la Muestra 21 (Figura 8A) y 26 (Figura 8B) como positivas con una infección de 30 minutos (una relación señal/fondo de > 3,0 es positiva), sin embargo la Muestra 24 (Figura 8C) requirió una infección de 2 horas para mostrar un resultado positivo. Los resultados de los luminómetros GloMax 20/20 y GloMax fueron similares.

[0076] La Figura 9 muestra datos para detectar muestras de esponja ambientales de *L. monocytogenes* de superficies inoculadas y enriquecidas durante 24 horas.

[0077] La Figura 10 muestra la detección de microorganismos en muestras de pavo inoculadas con *Salmonella* utilizando el aparato. Las señales se midieron utilizando tres luminómetros diferentes: GloMax, 3M e Hygiena.

[0078] Los ensayos de bacteriófagos recombinantes conservan la especificidad a lo largo del tiempo. En numerosas realizaciones a lo largo de varios años de desarrollo y utilización de ensayos de bacteriófagos recombinantes para, por ejemplo, *E. coli*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Listeria* y *S. aureus*, no se observaron cambios en la especificidad del hospedador. Estas realizaciones incluyen más de 25 bacteriófagos indicadores o marcadores de luciferasa recombinantes. Además, no se ha detectado la pérdida o inactivación del gen indicador o marcador

(por ejemplo, luciferasa) en ningún fago recombinante como se describe en la presente memoria. Los bacteriófagos recombinantes se almacenan y conservan en múltiples alícuotas para protegerlos contra un mal manejo. Aunque los bacteriófagos son intrínsecamente estables, los valores pueden disminuir en un grado variable durante un almacenamiento prolongado, por ejemplo, durante meses o años a 4 °C. En general, se cree que esto se debe a la pérdida de ADN de las partículas; sin embargo, los bacteriófagos activos se recuperan mediante el plaqueo en placas para obtener títulos más altos. La verificación de la especificidad se realiza con cada preparación de bacteriófagos recombinantes infectando distintas cepas bacterianas que se sabe son positivas y negativas.

[0079] En algunas realizaciones de los métodos para analizar muestras, el uso de un gran exceso de bacteriófagos recombinantes requiere la separación de cualquier bacteria no unida u otros componentes más grandes de la muestra del exceso de bacteriófago recombinante no unido. Esto puede lograrse de muchas formas distintas conocidas de forma general por un experto en la técnica. Las células de los microorganismos pueden separarse por centrifugación, filtración por tamaño o inmovilización selectiva. En algunas realizaciones, la filtración por tamaño se realiza a través de pocillos de filtro. En otros casos, la separación magnética puede utilizarse para la inmovilización selectiva. Por ejemplo, la muestra puede filtrarse a través de una membrana de 0,45 µm o 0,22 µm, antes o después de la incubación con el bacteriófago recombinante, para capturar el microorganismo diana (por ejemplo, una bacteria) sobre un soporte sólido. El microorganismo capturado puede lavarse entonces una o más veces sobre el soporte sólido para asegurarse de que solo quede el bacteriófago recombinante unido específicamente. O bien puede emplearse un mecanismo de unión específica o no específica para capturar el microorganismo en microperlas u otra superficie sólida. Son posibles otros formatos para separar los componentes de la muestra.

[0080] Pueden utilizarse diversos soportes sólidos. En ciertas realizaciones, el soporte sólido puede comprender una placa multipocillo, un filtro, una perla, una tira de flujo lateral, una tira de filtro, un disco de filtro, un papel de filtro o películas delgadas diseñadas para cultivar células (por ejemplo, PetriFilm de 3M). También pueden ser apropiados otros soportes sólidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el microorganismo de la muestra de ensayo puede capturarse uniéndolo a un hisopo, a la superficie de una placa, o filtrando la muestra a través de un filtro bacteriológico (por ejemplo, un filtro giratorio o un filtro de placa con un tamaño de poro de 0,45 µm). En una realización, el microorganismo capturado en la superficie del filtro o de la placa se incuba con bacteriófagos recombinantes y, posteriormente, se lava una o más veces para eliminar el exceso de bacteriófagos recombinantes no unidos.

[0081] De forma alternativa, en algunas realizaciones, la etapa de captura puede basarse en otras características del microorganismo de interés, como el tamaño. En las realizaciones que utilizan la captura basada en el tamaño, el soporte sólido puede ser un filtro de columna de centrifugación. En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una placa de filtro de 96 pocillos. O bien, el soporte sólido para la captura puede ser una localización en una matriz o un soporte móvil, tal como una perla.

[0082] En algunas realizaciones, el soporte sólido está recubierto con un componente de unión a células que se une con alta afinidad al microorganismo de interés en la muestra. Esto permite que más bacterias se unan al soporte sólido y aumenta la sensibilidad y especificidad del ensayo.

[0083] En un ejemplo, cuando el microorganismo de interés es una bacteria, el bacteriófago recombinante puede unirse a la bacteria a través de un dominio de unión celular del bacteriófago. Por ejemplo, fagos de *E. coli* bien estudiados incluyen T1, T2, T3, T4, T5, T7 y lambda; otros fagos de *E. coli* disponibles en la colección ATCC, por ejemplo, incluyen pHIX174, S13, Ox6, MS2, pHIV1, fd, PR772 y ZIK1. Los fagos de *Salmonella* incluyen SPN1S, 10, épsilon15, SEA1 y P22. Los fagos de *Listeria* incluyen LipZ5, P40, vB_LmoM_AG20, P70 y A511. Los fagos de *Staphylococcus* incluyen P4W, virus K, Twort, phi11, 187, P68 y phiWMY.

[0084] En algunas realizaciones, la muestra puede enriquecerse antes de analizarla mediante incubación en condiciones que fomenten el crecimiento. En tales realizaciones, el período de enriquecimiento puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o hasta 8 horas o más, dependiendo del tipo y tamaño de la muestra.

[0085] En otras realizaciones, la muestra puede enriquecerse después de la captura de la bacteria en un soporte sólido. En tales realizaciones, el período de enriquecimiento puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o hasta 8 horas o más, dependiendo del tipo y tamaño de la muestra.

[0086] Por lo tanto, el bacteriófago recombinante comprende un resto indicador detectable, y la unión a una sola célula patógena (por ejemplo, una bacteria) puede detectarse mediante una señal amplificada generada a través del resto indicador. Por lo tanto, el método, como se define en las reivindicaciones comprende detectar un resto indicador del bacteriófago recombinante, en donde la detección del indicador indica que la bacteria de interés está presente en la muestra.

[0087] En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el microorganismo puede detectarse sin ningún aislamiento o purificación de los microorganismos de una muestra. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una muestra que contiene uno o más microorganismos de interés puede aplicarse directamente a un recipiente de

ensayo, tal como una columna de centrífuga, un pocillo de microtitulación o un filtro, y el ensayo se lleva a cabo en ese recipiente de ensayo. Es decir, los microorganismos son capturados en una membrana que tiene un tamaño de poro demasiado pequeño para permitir el paso de los microorganismos. En la presente memoria se describen diversas realizaciones de dichos ensayos.

[0088] Las alícuotas de una muestra de ensayo pueden distribuirse directamente en los pocillos de una placa multipocillo, puede añadirse un bacteriófago recombinante y, después de un período de tiempo suficiente para la unión, las células pueden capturarse en una superficie sólida, tal como una placa, una perla o un sustrato de filtro, de modo que el exceso de bacteriófago recombinante no unido pueda eliminarse en una o más etapas de lavado posteriores. A continuación, se añade un sustrato para el resto indicador (por ejemplo, sustrato de luciferasa para un indicador de luciferasa) y se analiza para detectar la señal indicadora. Algunas realizaciones del método pueden realizarse sobre placas de filtro. Algunas realizaciones del método pueden realizarse con o sin concentración de la muestra antes de unirse al bacteriófago recombinante.

[0089] Por ejemplo, en muchos casos, se utilizan placas multipocillo para realizar los ensayos. La elección de las placas (o cualquier otro recipiente en donde pueda hacerse la detección) puede afectar a la etapa de detección. Por ejemplo, algunas placas pueden incluir un fondo de color o blanco, lo que puede afectar a la detección de emisiones de luz. De forma general, las placas blancas tienen una mayor sensibilidad, pero también producen una señal de fondo más alta. Otros colores de las placas pueden generar una señal de fondo más baja, pero también tienen una sensibilidad ligeramente inferior. Además, la señal de fondo puede resultar de la fuga de luz de un pocillo a otro pocillo adyacente. Algunas placas tienen pocillos blancos, mientras que el resto de la placa es negra, lo que permite una señal alta dentro del pocillo e impide la fuga de luz de pocillo a pocillo. Esta combinación de pocillos blancos con placas negras puede reducir la señal de fondo. Por lo tanto, la elección de la placa u otro recipiente de ensayo puede influir en la sensibilidad y en la señal de fondo del ensayo. En algunas realizaciones, la detección del microorganismo de interés puede completarse sin la necesidad de cultivar la muestra. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el tiempo total requerido para la detección es inferior a 12,0 horas, 11,0 horas, 10,0 horas, 9,0 horas, 8,0 horas, 7,0 horas, 6,0 horas, 5,0 horas, 4,0 horas, 3,0 horas, 2,5 horas, 2,0 horas, 1,5 horas, 1,0 horas, 45 minutos o menos de 30 minutos. Minimizar el tiempo necesario para obtener los resultados es fundamental en ensayos alimentarios y ambientales para detectar patógenos.

[0090] A diferencia de los ensayos conocidos en la técnica, el método de la invención puede detectar microorganismos individuales. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el método puede detectar ≤ 10 células del microorganismo (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 microorganismos) o ≤ 20 , o ≤ 30 , o ≤ 40 , o ≤ 50 , o ≤ 60 , o ≤ 70 , o ≤ 80 , o ≤ 90 , o ≤ 100 , o ≤ 200 , o ≤ 500 , o ≤ 1000 células del microorganismo presente en una muestra. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el bacteriófago recombinante es altamente específico para *S. aureus*, *Listeria*, *Salmonella*, o *E. coli*. En una realización, el bacteriófago recombinante puede distinguir *S. aureus*, *Listeria*, *Salmonella* o *E. coli* en presencia de más de 100 tipos distintos de bacterias. En una realización, el bacteriófago recombinante puede distinguir un serotipo específico dentro de una especie de bacteria (por ejemplo, *E. coli* O157:H7) en presencia de más de 100 tipos distintos de bacterias. En ciertas realizaciones, el bacteriófago recombinante puede utilizarse para detectar una sola bacteria del tipo específico en la muestra. En ciertas realizaciones, el bacteriófago recombinante detecta tan solo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 de las bacterias específicas de la muestra.

[0091] El resto indicador puede reaccionar con un sustrato para emitir una señal detectable o puede emitir una señal intrínseca (por ejemplo, proteína fluorescente). Las proteínas fluorescentes emiten fluorescencia de forma natural (fluorescencia intrínseca o autofluorescencia) emitiendo energía en forma de fotón cuando el resto fluorescente que contiene electrones absorbe un fotón. Pueden expresarse proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) como una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la sensibilidad de detección puede revelar la presencia de tan solo 100, 50, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 células del microorganismo de interés en una muestra de ensayo. En algunas realizaciones, incluso una sola célula del microorganismo de interés puede producir una señal detectable.

[0092] La selección de un resto indicador particular no es crítica para la presente invención, pero el resto indicador será capaz de generar una señal detectable por sí misma, o ser detectable mediante instrumentos, o ser detectable junto con uno o más componentes productores de señales adicionales, tales como un sistema productor de señales de enzima/sustrato. Pueden formarse varios bacteriófagos recombinantes variando el resto indicador o el indicador del bacteriófago recombinante; un experto en la técnica apreciará que la elección implica la consideración del microorganismo a detectar y los medios de detección deseados.

[0093] Por ejemplo, uno o más componentes productores de señales pueden reaccionar con el resto indicador para generar una señal detectable. En algunas realizaciones, el indicador puede ser un compuesto bioluminiscente. Si el resto indicador es una enzima, entonces la amplificación de la señal detectable se obtiene haciendo reaccionar la enzima con uno o más sustratos o enzimas y sustratos adicionales para producir un producto de reacción detectable. En un sistema productor de señales alternativo, el indicador puede ser un compuesto fluorescente en donde no se requiere ninguna manipulación enzimática del indicador para producir la señal detectable. Moléculas fluorescentes que incluyen, por ejemplo, fluoresceína y rodamina y sus derivados y análogos, son adecuadas para

su uso como indicadores en tal sistema. En otra realización alternativa, el resto indicador puede ser un cofactor, a continuación se obtiene la amplificación de la señal detectable haciendo reaccionar el cofactor con la enzima y uno o más sustratos o enzimas y sustratos adicionales para producir un producto de reacción detectable. En algunas realizaciones, la señal detectable es colorimétrica.

[0094] El resto indicador detectable es una característica clave del bacteriófago recombinante, que puede detectarse de forma directa o indirecta. El resto indicador proporciona una señal detectable por la que se monitoriza la reacción de unión proporcionando una medida cualitativa y/o cuantitativa. La cantidad relativa y la localización de la señal generada por los microorganismos marcados o señalizados pueden servir para indicar la presencia y/o cantidad del microorganismo. El resto indicador también se puede utilizar para seleccionar y aislar microorganismos marcados o señalizados, tal como mediante clasificación por flujo o utilizando medios de separación magnéticos.

[0095] En algunas realizaciones, el resto indicador del bacteriófago recombinante puede detectarse directamente o después de la incubación con un sustrato. En la técnica se conocen muchos tipos diferentes de biomoléculas detectables adecuadas para su uso como fracciones indicadoras, y muchas están disponibles comercialmente. En algunas realizaciones, el bacteriófago recombinante comprende una enzima, que sirve como resto indicador. En algunas realizaciones, el indicador o marcador del bacteriófago recombinante codifica una enzima detectable. El resto indicador puede emitir luz y/o puede detectarse mediante un cambio de color. Se comercializan varias enzimas apropiadas, tales como fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano (HRP), proteína verde fluorescente (GFP) o luciferasa (Luc). En algunas realizaciones, estas enzimas pueden servir como resto indicador. En algunas realizaciones, la luciferasa de luciérnaga es el resto indicador. En algunas realizaciones, la luciferasa de *Oplophorus* es el resto indicador. En algunas realizaciones, NANOLUC[®] es el resto indicador. Otras luciferasas modificadas por ingeniería genética u otras enzimas que generan señales detectables también pueden ser restos indicadores adecuados.

[0096] Por lo tanto, en algunas realizaciones, el bacteriófago recombinante de los métodos o sistemas es un bacteriófago de tipo salvaje modificado genéticamente con la secuencia de una proteína indicadora, tal como una proteína fluorescente o una proteína luciferasa.

[0097] Los bacteriófagos pueden infectar y lisar bacterias específicas.

[0098] La detección del indicador puede incluir la detección de emisiones de luz. En algunas realizaciones, puede utilizarse un luminómetro para detectar la reacción del indicador (por ejemplo, la luciferasa) con un sustrato. La detección de la ULR se puede lograr con un luminómetro, o también pueden utilizarse otras máquinas o dispositivos. Por ejemplo, un espectrofotómetro, una cámara CCD o una cámara CMOS pueden detectar cambios de color y otras emisiones de luz. Las ULR absolutas son importantes para la detección, pero la relación señal/fondo también debe ser alta (por ejemplo, > 2,0, > 2,5 o > 3,0) para que se detecten de forma fiable las células individuales o un número reducido de células.

[0099] En algunas realizaciones, la reacción del resto indicador (por ejemplo, la luciferasa) con el sustrato puede continuar durante 30 minutos o más, y la detección en varios puntos temporales puede ser deseable para optimizar la sensibilidad. Por ejemplo, las lecturas del luminómetro pueden tomarse inicialmente y a intervalos de 3, 5, 10 o 15 minutos hasta que se complete la reacción.

[0100] Por lo tanto, la invención comprende un método para detectar un microorganismo de interés, como se define en las reivindicaciones, que comprende las etapas de capturar al menos una bacteria de muestra; incubar la al menos una bacteria con una pluralidad de bacteriófagos recombinantes; dar tiempo a la unión al microorganismo diana de la muestra; y detectar el resto indicador, en donde la detección del resto indicador demuestra que la bacteria está presente en la muestra.

[0101] Por ejemplo, en algunas realizaciones, la bacteria de la muestra de ensayo puede capturarse por unión a la superficie de una placa o filtrando la muestra a través de un filtro bacteriológico (por ejemplo, un filtro de centrifuga o un filtro de placa con un tamaño de poro de 0,45 µm). En una realización, el bacteriófago recombinante se añade en un volumen mínimo o modesto a la muestra capturada directamente en el filtro. En una realización, el microorganismo capturado en la superficie del filtro o la placa se lava posteriormente una o más veces para eliminar el exceso de bacteriófagos recombinantes no unidos.

[0102] En algunas realizaciones, pueden aplicarse alícuotas de una muestra de ensayo que comprende bacterias a una columna de centrifuga y, tras la incubación con un bacteriófago recombinante y el lavado para eliminar cualquier exceso de bacteriófago, la cantidad de indicador detectado será proporcional a la cantidad de bacterias diana presentes en la muestra.

[0103] El indicador (por ejemplo, la luciferasa) unido a la bacteria puede entonces medirse y cuantificarse. En un ejemplo, la solución se hace pasar a través del filtro y el filtrado se recoge para su análisis en un nuevo receptáculo (por ejemplo, en un luminómetro) tras la adición de un sustrato para la enzima indicadora (por ejemplo, un sustrato de luciferasa). De forma alternativa, la señal indicadora puede medirse directamente en el filtro.

5 [0104] En una realización, el microorganismo es una bacteria y el bacteriófago recombinante incluye un resto indicador derivado de un bacteriófago. En una realización, el resto indicador es luciferasa. Por lo tanto, en una realización alternativa, el sustrato indicador (por ejemplo, el sustrato de luciferasa) puede incubarse con la parte de la muestra que permanece en un filtro o unida a la superficie de una placa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el soporte sólido es una placa de filtro de 96 pocillos (o una placa normal de 96 pocillos), y la reacción del sustrato puede detectarse poniendo la placa directamente en el luminómetro.

10 [0105] Por ejemplo, en una realización, la invención puede comprender un método para detectar una bacteria patógena de interés, como se define en las reivindicaciones, que comprende las etapas de: unir las células capturadas en una placa de filtro de 96 pocillos con una pluralidad de bacteriófagos recombinantes; eliminar el exceso de bacteriófagos recombinantes; y detectar el indicador (por ejemplo, luciferasa) añadiendo sustrato y midiendo la actividad enzimática directamente en la placa de 96 pocillos, donde la detección de la actividad enzimática indica que la bacteria de interés está presente en la muestra.

15 [0106] En otra realización, la invención puede comprender un método para detectar un microorganismo de interés tal como se define en las reivindicaciones, tal como *S. aureus*, que comprende las etapas de: unir las células en solución o suspensión líquida en una placa de 96 pocillos con una pluralidad de bacteriófagos recombinantes; separar el bacteriófago recombinante no unido de las células que tienen el bacteriófago recombinante unido; y detectar el indicador (por ejemplo, luciferasa) añadiendo sustrato y midiendo la actividad enzimática directamente en la placa de 96 pocillos, en donde la detección de la actividad enzimática indica que el microorganismo de interés, tal como *S. aureus*, está presente en la muestra. En algunas realizaciones, el microorganismo de interés puede capturarse en un soporte sólido, tal como en perlas o un filtro. Esta captura puede producirse antes o después de la incubación con el bacteriófago recombinante. En algunas realizaciones, no es necesaria ninguna etapa de captura.

20 [0107] En algunas realizaciones, la solución o suspensión líquida puede ser una muestra de prueba consumible, tal como un lavado de verduras. En algunas realizaciones, la solución o suspensión líquida puede ser un líquido vegetal enriquecido con caldo LB concentrado, caldo de soja triptico/triptona, agua con peptona o caldo nutritivo. En algunas realizaciones, la solución o suspensión líquida puede ser una bacteria diluida en caldo LB.

25 [0108] En algunas realizaciones, las células del microorganismo diana deben estar intactas para una detección adecuada. Es decir, las células no necesitan ser viables, pero la pared celular debe estar estructuralmente intacta. Por lo tanto, es deseable minimizar la lisis de la bacteria antes de la etapa de detección.

30 [0109] En algunas realizaciones, es útil una etapa de concentración inicial para la muestra. Es decir, cualquier microorganismo u otra sustancia relativamente grande en la muestra se concentra para eliminar el exceso de líquido. Sin embargo, es posible realizar el ensayo sin una etapa de concentración inicial. Algunas realizaciones incluyen una etapa de concentración inicial y, en algunas realizaciones, esta etapa de concentración permite un tiempo de incubación de enriquecimiento más corto. En otras realizaciones, no es necesario ningún período de enriquecimiento.

35 [0110] Algunas realizaciones de los métodos de prueba pueden incluir además ensayos confirmatorios. En la técnica se conocen diversos ensayos para confirmar un resultado inicial, normalmente en un momento posterior. Por ejemplo, las muestras pueden cultivarse (por ejemplo, el ensayo CHROMAGAR®/DYNABEADS®), puede utilizarse la PCR para confirmar la presencia del ADN microbiano o pueden utilizarse otros ensayos confirmatorios para confirmar el resultado inicial.

40 [0111] Las realizaciones de los ensayos de seguridad alimentaria incluyen etapas de preparación de muestras. Algunas realizaciones pueden incluir el tiempo de enriquecimiento. Por ejemplo, puede ser necesario un enriquecimiento durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas, según el tipo y el tamaño de la muestra. Tras estas etapas de preparación de la muestra, la unión con una alta concentración de bacteriófago recombinante que comprende un indicador o marcador puede realizarse en una variedad de formatos de ensayo, como el que se muestra en la **Figura 1**.

45 [0112] Los ensayos alimentarios pueden detectar una sola bacteria patógena en tamaños de muestra que corresponden a los estándares de la industria, con una reducción en el tiempo de obtención de resultados de al menos 20 %, o al menos 30 %, o al menos 40 % o al menos 50 % o al menos 60 %, según el tipo y el tamaño de la muestra.

50 [0113] Por lo tanto, algunas realizaciones de la presente invención resuelven una necesidad mediante el uso de métodos bacteriófagos recombinantes para amplificar una señal detectable que indica la presencia de bacterias. En ciertas realizaciones, se detecta apenas una sola bacteria. Los principios aplicados en la presente memoria pueden aplicarse a la detección de una variedad de microorganismos. De este modo, las realizaciones de la presente invención pueden lograr una enorme amplificación de la señal incluso a partir de una sola célula del microorganismo de interés.

[0114] Los aspectos de la presente invención utilizan la alta especificidad de los componentes de unión que pueden unirse a microorganismos particulares, tales como el componente de reconocimiento y unión de los agentes infecciosos, como un medio para detectar y/o cuantificar el microorganismo específico en una muestra. En algunas realizaciones, la presente invención aprovecha la especificidad de los bacteriófagos.

[0115] Algunas realizaciones de la invención descritas y descritas en la presente memoria utilizan el descubrimiento de que un solo microorganismo es capaz de generar una gran cantidad de indicador después de la infección con bacteriófagos recombinantes. Este principio permite la amplificación de la señal indicadora de una o unas pocas células basándose en el reconocimiento específico del microorganismo. Por ejemplo, al exponer incluso una sola célula de una bacteria a una pluralidad de bacteriófagos recombinantes, la señal indicadora se amplifica de forma que sea detectable una sola bacteria.

[0116] La velocidad y sensibilidad sin precedentes de la detección de un microorganismo con bacteriófagos recombinantes son resultados inesperados. En algunas realizaciones, los métodos de la invención requieren menos de 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 horas para la detección de un microorganismo de interés. Se trata de plazos más cortos de lo que anteriormente se creía posible. En algunas realizaciones, los métodos pueden detectar tan solo 100, 50, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 células de la bacteria de interés. En algunas realizaciones, incluso una sola célula de la bacteria es detectable. En realizaciones adicionales, la invención comprende sistemas (por ejemplo, sistemas informáticos, sistemas automatizados o kits) que comprenden componentes para realizar los métodos descritos en la presente memoria y/o utilizar los bacteriófagos recombinantes descritos en la presente memoria.

[0117] Los protocolos existentes para la detección de bacterias patógenas en los alimentos son complicados, caros, lentos, laboriosos y propensos a generar falsos positivos. Además, los métodos de detección basados en fagos incluyen la complicación adicional y las implicaciones reguladoras de los reactivos infecciosos. La detección con un bacteriófago recombinante específico para un patógeno determinado ofrece una alternativa de prueba eficaz, rápida y sencilla.

[0118] Los agentes infecciosos pueden ser altamente específicos para un tipo particular de organismo. Por ejemplo, un bacteriófago puede ser específico para un género particular de una bacteria, como *Listeria*. Por ejemplo, el bacteriófago A511 es específico para el género *Listeria*. O un bacteriófago puede ser específico para una especie particular de bacteria, tal como *E. coli*. Para algunos tipos de bacterias, los bacteriófagos pueden incluso reconocer subtipos particulares de ese organismo con una alta especificidad. Por ejemplo, el bacteriófago CBA120 es altamente específico para *E. coli* O157:H7 y el bacteriófago ϕ YeO3-12 es altamente específico para *Y. enterocolitica* serotipo O:3.

[0119] En algunas realizaciones del bacteriófago recombinante descrito en la presente memoria, el bacteriófago recombinante puede derivarse de T7, T4, tipo T4, Vil, tipo Vil, AR1, A511, A118, A006, A500, PSA, P35, P40, B025, B054, A97, pHisM101, phi3626, CBA120, SPN1S, 10, ϵ psilon 15, P22, LiPz5, P40, VB_LMOM_AG20, P70, A511, P4W, K, Twort o SA97. Un bacteriófago recombinante también incluye un resto indicador, tal como un resto fluorescente, una proteína fluorescente, una proteína bioluminiscente o una enzima, que permite que el bacteriófago recombinante genere una señal. En un bacteriófago recombinante, se insertan varios tipos de indicadores en el genoma del bacteriófago, para que sirvan como un resto indicador. En algunas realizaciones, el bacteriófago recombinante comprende una enzima, tal como una luciferasa, que solo es detectable tras la adición de un sustrato apropiado. Por ejemplo, la luciferasa, la fosfatasa alcalina y otras enzimas indicadoras reaccionan con un sustrato apropiado para proporcionar una señal detectable. Algunas realizaciones de un bacteriófago recombinante incluyen una luciferasa de tipo salvaje o una luciferasa modificada, como NANOLUC[®]. Otras realizaciones incluyen una proteína fluorescente u otra proteína marcadora.

[0120] En realizaciones alternativas pueden estudiarse o copiarse bacteriófagos, fagos, micobacteriófagos (tales como para el bacilo de la tuberculosis y de la paratuberculosis), micófagos (tales como para hongos), fagos de micoplasmas y cualquier otro virus que pueda invadir bacterias, hongos, micoplasmas, protozoos, levaduras y otros organismos vivos microscópicos vivos para seleccionar un microorganismo de interés. Por ejemplo, los fagos de *E. coli* bien estudiados incluyen T1, T2, T3, T4, T5, T7 y lambda; otros fagos de *E. coli* disponibles en la colección ATCC, por ejemplo, incluyen pHiX174, S13, Ox6, MS2, pHIV1, fd, PR772 y ZIK1. Los fagos de *Salmonella* incluyen SPN1S, 10, ϵ psilon15, SEA1 y P22. Los fagos de *Listeria* incluyen LiPz5, P40, VB_LMOM_Ag20, P70 y A511. Los fagos del *estafilococo* incluyen P4W, virus K, Twort, phi11, 187, P68 y PhiWmy.

[0121] Algunas realizaciones de la invención utilizan la especificidad de la unión de un bacteriófago recombinante para una selección rápida y sensible para unirse y facilitar la detección de una bacteria de interés.

[0122] En algunas realizaciones, un bacteriófago recombinante se deriva de un bacteriófago específico para una bacteria diana de interés, tal como de T7, T4 u otro fago similar. Un bacteriófago recombinante también puede derivarse de los fagos tipo T4, tipo T7, Vil, tipo Vil, AR1, A511, A118, A006, A500, PSA, P35, P40, B025, B054, A97, phiSM101, phi3626, CBA120, SPN1S, 10, ϵ psilon15, PpZ5, P40, VB_LMOM_AG20, P70, A511, P4W, K, Twort o SA97.

[0123] En algunas realizaciones, puede ser deseable un producto del gen indicador pequeño. Las proteínas OpLuc y NANOLUC® tienen solo aproximadamente 20 kDa (aproximadamente 500-600 pb codificantes), mientras que FluC tiene aproximadamente 62 kDa y requiere aproximadamente 1700 pb codificantes. A modo de comparación, el genoma de T7 es de aproximadamente 40 kpb, mientras que el genoma de T4 es de aproximadamente 170 kpb.

[0124] Además, el indicador debe generar una alta relación señal/fondo y debe ser fácilmente detectable de forma oportuna. NANOLUC® de Promega es una luciferasa modificada de *Oplophorus gracilirostris* (camarón de aguas profundas). En algunas realizaciones, NANOLUC® combinado con NANO-GLO® de Promega, un sustrato de imidazopirazinona (furimazina), puede proporcionar una señal robusta con bajo nivel de fondo.

[0125] En algunas realizaciones de bacteriófagos recombinantes, un resto indicador puede ser cualquiera de una variedad de biomoléculas. El indicador puede ser un producto detectable o una enzima que produce un producto detectable o un cofactor para una enzima que produce un producto detectable. En algunas realizaciones, el resto indicador de un bacteriófago recombinante es un indicador, tal como una enzima detectable. El producto del gen indicador puede generar luz y/o puede detectarse mediante un cambio de color. Se comercializan diversas enzimas adecuadas, tales como fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano (HRP) o luciferasa (Luc). Por ejemplo, en una realización, el indicador es una enzima luciferasa. Pueden utilizarse varios tipos de luciferasa. En realizaciones alternativas, y como se describe con más detalle en la presente memoria, la luciferasa es una de las siguientes: luciferasa de *Oplophorus*, luciferasa de luciérnaga, luciferasa Lucia, luciferasa Renilla o una luciferasa diseñada. En algunas realizaciones, la luciferasa se ha obtenido de *Oplophorus*. En algunas realizaciones, el indicador es una luciferasa modificada genéticamente, tal como NANOLUC®. Otras luciferasas modificadas por ingeniería genética u otras enzimas que generan señales detectables también pueden ser restos indicadores adecuados. En algunas realizaciones, estas enzimas pueden servir como resto indicador.

[0126] El uno o más bacteriófagos recombinantes se derivan de uno o más agentes infecciosos de tipo salvaje (por ejemplo, bacteriófagos) y uno o más restos indicadores. Las composiciones utilizadas en los métodos y sistemas descritos pueden incluir cócteles de distintos bacteriófagos recombinantes que pueden generar señales indicadoras iguales o distintas. Es decir, una composición para detectar un microorganismo puede incluir todos los bacteriófagos recombinantes iguales o distintos.

[0127] Los ensayos descritos anteriormente utilizan bacteriófagos recombinantes que reconocen y se unen a bacterias específicas. Los ensayos de bacteriófagos recombinantes pueden hacerse en un entorno de laboratorio tradicional o en un dispositivo, tal como, por ejemplo, un aparato como se describe más adelante en la presente memoria.

Bacteriófago recombinante

[0128] Como se describe con más detalle en la presente memoria, los aparatos, métodos y sistemas de la invención comprenden bacteriófagos recombinantes para su uso en la detección de microorganismos de interés. El bacteriófago recombinante está comprendido en el primer compartimento del aparato descrito anteriormente. El bacteriófago recombinante tienen un gen indicador incorporado en el genoma del bacteriófago. En algunas realizaciones, el gen indicador está unido operativamente a un promotor que no es un promotor nativo del bacteriófago. En algunas realizaciones, el gen indicador está unido operativamente a un promotor nativo del bacteriófago. El bacteriófago recombinante que comprende el gen indicador también se denomina bacteriófago indicador en esta descripción.

[0129] El bacteriófago recombinante incluye un gen indicador. En ciertas realizaciones del bacteriófago, el gen indicador no codifica una proteína de fusión. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la expresión del gen indicador durante la replicación del bacteriófago después de la infección de una bacteria hospedadora da lugar a un producto proteínico indicador soluble. En ciertas realizaciones, el gen indicador puede insertarse en una región génica tardía del bacteriófago. Los genes tardíos generalmente se expresan a niveles más altos que otros genes de fagos, ya que codifican proteínas estructurales. La región génica tardía puede ser una región génica de clase III y puede incluir un gen para una proteína principal de la cápside.

[0130] Algunas realizaciones incluyen el diseño (y, opcionalmente, la preparación) de una secuencia para la recombinación homóloga corriente abajo del gen de la proteína principal de la cápside. Otras realizaciones incluyen el diseño (y, opcionalmente, la preparación) de una secuencia para la recombinación homóloga corriente arriba del gen de la proteína principal de la cápside. En algunas realizaciones, la secuencia comprende un gen indicador con codones optimizados precedido por una región no traducida. La región no traducida puede incluir un promotor del gen tardío del fago y un sitio de entrada al ribosoma.

[0131] En algunas realizaciones, un bacteriófago indicador se deriva de A511, P100, el fago de Listeria LMTA-94, LMA4, LMA8, T7, T4 u otro fago similar. Un bacteriófago indicador también puede derivarse del virus P100, bacteriófagos específicos del virus P100, de tipo T4, de tipo T7, de tipo VII, de tipo VII, de Cronobacter, de Salmonella, de Listeria o de estafilococo, u otro bacteriófago que tenga un genoma con al menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de homología con

bacteriófagos T7, tipo T7, T4, tipo T4, virus P100, bacteriófagos específicos de *Cronobacter*, *Salmonella*, *Listeria* o *Staphylococcus*, bacteriófagos Vli o tipo VII (o tipo Vi1), según GenBank/NC Bi). En algunas realizaciones, el fago indicador se deriva de un bacteriófago que es altamente específico de un microorganismo patógeno particular. Las modificaciones genéticas pueden evitar las deleciones de los genes de tipo salvaje y, por lo tanto, el fago modificado puede permanecer más similar al bacteriófago de tipo salvaje que muchos fagos comercializados. Los bacteriófagos obtenidos del medio ambiente pueden ser más específicos para las bacterias que se encuentran en el medio ambiente y, como tales, genéticamente distintos de los fagos disponibles comercialmente.

[0132] Además, los genes de los fagos que se cree son no esenciales pueden tener una función no reconocida. Por ejemplo, un gen aparentemente no esencial puede tener una función importante en la elevación del tamaño de ruptura, como funciones sutiles de corte, ajuste o recorte durante el ensamblado. Por lo tanto, eliminar genes para insertar un indicador puede ser perjudicial. La mayoría de los fagos pueden empaquetar un ADN que es un poco más grande que su genoma natural. Con esta consideración, un gen indicador más pequeño puede ser una opción más apropiada para modificar un bacteriófago, especialmente uno con un genoma más pequeño. Las proteínas OpLuc y NANOLUC[®] tienen solo aproximadamente 20 kDa (aproximadamente 500-600 pb para codificar), mientras que FluC tiene aproximadamente 62 kDa (aproximadamente 1700 pb para codificar). A modo de comparación, el genoma de T7 tiene alrededor de 40 kpb, mientras que el genoma de la T4 tiene aproximadamente 170 kpb y el genoma del bacteriófago específico de *Cronobacter*, *Salmonella* o *Staphylococcus* es de aproximadamente 157 kpb. Además, el gen indicador no debe ser expresada de forma endógena por la bacteria (es decir, no forma parte del genoma bacteriano), debe generar una alta relación señal/fondo y debe ser fácilmente detectable de forma oportuna. NANOLUC[®] de Promega es una luciferasa modificada de *Oplophorus gracilirostris* (camarón de aguas profundas). En algunas realizaciones, NANOLUC[®] combinado con NANO-GLO[®] de Promega, un sustrato de imidazopirazinona (furimazina), puede proporcionar una señal robusta con bajo nivel de fondo.

[0133] En algunas realizaciones de fagos indicadores, el gen indicador puede insertarse en una región no traducida para evitar la alteración de los genes funcionales, dejando intactos los genes de los fagos de tipo salvaje, lo que puede dar lugar a una mayor idoneidad para infectar cepas de bacterias que no sean de laboratorio. Además, incluir codones de terminación en los tres marcos de lectura puede ayudar a aumentar la expresión al reducir la lectura completa, también conocida como expresión “leaky” o defectuosa. Esta estrategia también puede eliminar la posibilidad de que se produzca una proteína de fusión a niveles bajos, lo que se manifestaría como una señal de fondo (por ejemplo, luciferasa) que no se puede separar del fago.

[0134] Un gen indicador puede expresar una variedad de biomoléculas. El gen indicador es un gen que expresa un producto detectable o una enzima que produce un producto detectable. Por ejemplo, en una realización, el gen indicador codifica una enzima luciferasa. Pueden utilizarse varios tipos de luciferasa. En realizaciones alternativas, y como se describe con más detalle en la presente memoria, la luciferasa es una de las siguientes: luciferasa de *Oplophorus*, luciferasa de luciérnaga, luciferasa Lucia, luciferasa Renilla o una luciferasa diseñada. En algunas realizaciones, el gen de la luciferasa se obtiene de *Oplophorus*. En algunas realizaciones, el gen indicador es un gen luciferasa modificado genéticamente, tal como NANOLUC[®].

[0135] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la presente invención comprende un bacteriófago modificado genéticamente que comprende un gen indicador no bacteriófago en la región génica tardía (clase III). En algunas realizaciones, el gen indicador no nativo está bajo el control de un promotor tardío. El uso de un promotor génico tardío asegura que el gen indicador (por ejemplo, la luciferasa) no solo se exprese a niveles altos, como las proteínas de la cápside viral, sino que tampoco se desactive como los genes bacterianos endógenos o incluso los genes virales tempranos.

[0136] En algunas realizaciones, el promotor tardío es un promotor similar a los de los virus P100, T4, T7 o Vil, u otro promotor de fagos similar al encontrado en el fago de tipo salvaje seleccionado, es decir, sin modificación genética. La región génica tardía puede ser una región génica de clase III, y el bacteriófago puede derivarse de un bacteriófago T7, T4, tipo T4, Vil, tipo Vil, específico de *Cronobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria* o *S. aureus*, u otro bacteriófago natural que tenga un genoma con al menos un 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de homología con T7, bacteriófagos T4, tipo T4, Vil, tipo Vil o específicos de *Cronobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria* o *S. aureus*.

[0137] Las modificaciones genéticas de los bacteriófagos pueden incluir inserciones, eliminaciones o sustituciones de un pequeño fragmento de ácido nucleico, de una parte sustancial de un gen o de un gen completo. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos insertados o sustituidos comprenden secuencias no nativas. Puede insertarse un gen indicador no nativo en el genoma de un bacteriófago de modo que esté bajo el control de un promotor de bacteriófago. En algunas realizaciones, el gen indicador no nativo no forma parte de una proteína de fusión. Es decir, en algunas realizaciones, una modificación genética puede configurarse de forma que el producto proteínico indicador no comprenda polipéptidos del bacteriófago de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el producto proteínico indicador es soluble. En algunas realizaciones, la invención comprende un método para detectar una bacteria de interés que comprende la etapa de incubar una muestra de ensayo con tal bacteriófago recombinante.

5 [0138] En algunas realizaciones, la expresión del gen indicador en el bacteriófago de la progenie después de la infección de la bacteria hospedadora da lugar a un producto proteínico soluble y libre. En algunas realizaciones, el gen indicador no nativo no es contiguo a un gen que codifica una proteína fágica estructural y, por lo tanto, no produce una proteína de fusión. A diferencia de los sistemas que emplean una fusión de un resto de detección con la proteína de la cápside (es decir, una proteína de fusión), algunas realizaciones de la presente invención expresan un indicador o marcador soluble (por ejemplo, la luciferasa soluble). En algunas realizaciones, el indicador o marcador está idealmente libre de la estructura del bacteriófago. Es decir, el indicador o marcador no está unido a la estructura del fago. Como tal, el gen del indicador o marcador no se fusiona con otros genes del genoma del fago recombinante. Esto puede aumentar considerablemente la sensibilidad del ensayo (hasta de una sola bacteria) y simplificar el ensayo, ya que permite que el ensayo se complete en menos de una hora en algunas realizaciones, en vez de en varias horas debido a las etapas de purificación adicionales requeridas con los constructos que producen proteínas de fusión detectables. Además, las proteínas de fusión pueden ser menos activas que las proteínas solubles debido, por ejemplo, a restricciones de plegamiento de las proteínas que pueden alterar la conformación del sitio activo de la enzima o el acceso al sustrato.

15 [0139] Además, las proteínas de fusión, por definición, limitan el número de fracciones unidas a las subunidades de una proteína en el bacteriófago. Por ejemplo, el uso de un sistema disponible en el mercado diseñado para servir como plataforma para una proteína de fusión daría lugar a aproximadamente 415 copias del resto de fusión, que corresponden a las aproximadamente 415 copias de la proteína de la cápside del gen 10B en cada partícula del bacteriófago T7. Sin esta restricción, puede esperarse que las bacterias infectadas expresen muchas más copias del resto de detección (por ejemplo, luciferasa) de las que caben en el bacteriófago. Además, las proteínas de fusión grandes, como la fusión cápside-luciferasa, pueden inhibir el ensamblado de la partícula de bacteriófago, produciendo por tanto una menor progenie de bacteriófagos. Por lo tanto, puede ser preferible un producto del gen indicador soluble que no sea una fusión.

20 [0140] En algunas realizaciones, el fago indicador codifica un marcador, tal como una enzima detectable. El producto del gen indicador puede generar luz y/o puede detectarse mediante un cambio de color. Se comercializan diversas enzimas adecuadas, tales como fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano (HRP) o luciferasa (Luc). En algunas realizaciones, estas enzimas pueden servir como resto indicador. En algunas realizaciones, la luciferasa de luciérnaga es el resto indicador. En algunas realizaciones, la luciferasa de *Oplophorus* es el resto indicador. En algunas realizaciones, NANOLUC® es el resto indicador. Otras luciferasas modificadas por ingeniería genética u otras enzimas que generan señales detectables también pueden ser restos indicadores adecuados.

25 [0141] En algunas realizaciones, el uso de un resto de detección soluble elimina la necesidad de eliminar el fago parental contaminante del lisado de las células de muestra infectadas. Con un sistema de proteínas de fusión, cualquier bacteriófago utilizado para infectar las células de la muestra tendría el resto de detección unido y sería indistinguible del bacteriófago hijo que también contiene el resto de detección. Como la detección de bacterias de muestra se basa en la detección de un resto de detección recién creada (sintetizada *de novo*), el uso de constructos de fusión requiere etapas adicionales para separar los restos antiguos (parentales) de los restos recién creadas (bacteriófagos hijos). Esto puede conseguirse lavando las células infectadas varias veces, antes de completar el ciclo de vida del bacteriófago, inactivando el exceso de fagos parentales después de la infección por medios físicos o químicos, y/o modificando químicamente el bacteriófago parental con un resto de unión (tal como biotina), que luego puede unirse y separarse (tal como mediante perlas de sefarosa recubiertas de estreptavidina). Sin embargo, incluso con todos estos intentos de eliminación, el fago parental puede permanecer cuando se utiliza una concentración elevada del fago parental para asegurar la infección de un número reducido de células de la muestra, creando una señal de fondo que puede dificultar la detección de la señal del fago de la progenie celular infectada.

35 [0142] Por el contrario, con el resto de detección soluble expresado en algunas realizaciones de la presente invención, la purificación del fago parental a partir del lisado final es innecesaria, ya que el fago parental no tiene ningún resto de detección unido. Por lo tanto, cualquier resto de detección presente después de la infección debe haberse creado *de novo*, indicando la presencia de una bacteria o bacterias infectadas. Para aprovechar este beneficio, la producción y preparación del fago parental puede incluir la purificación del fago a partir de cualquier resto de detección libre producido durante la producción del bacteriófago parental en cultivo bacteriano. Pueden emplearse técnicas estándar de purificación de bacteriófagos para purificar algunas realizaciones de fagos según la presente invención, tales como centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, centrifugación en gradiente de densidad isopícnica con cloruro de cesio, HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño y diálisis o tecnologías derivadas (tales como los concentradores de la marca Amicon - Millipore, Inc.). Puede emplearse ultracentrifugación isopícnica con cloruro de cesio como parte de la preparación del fago recombinante de la invención, para separar las partículas del fago parental de la proteína luciferasa contaminante producida tras la propagación del fago en el huésped bacteriano. De este modo, el bacteriófago recombinante parental de la invención está sustancialmente exenta de cualquier luciferasa generada durante la producción en la bacteria. La eliminación de la luciferasa residual presente en la reserva de fagos puede reducir sustancialmente la señal de fondo observada cuando los bacteriófagos recombinantes se incuban con una muestra de ensayo.

60 [0143] En algunas realizaciones de bacteriófagos modificados, el promotor tardío (promotor de clase III, por ejemplo, del fago específico de *Listeria*, T7, T4 o VII) tiene una alta afinidad por la ARN polimerasa del mismo

bacteriófago que transcribe los genes de las proteínas estructurales ensambladas en la partícula del bacteriófago. Estas proteínas son las proteínas más abundantes producidas por el fago, ya que cada partícula de bacteriófago comprende docenas o cientos de copias de estas moléculas. El uso de un promotor tardío viral puede garantizar un nivel de expresión óptimamente alto del resto de detección de luciferasa. El uso de un promotor viral tardío derivado, específico o activo en el bacteriófago natural original del que se deriva el fago indicador (p. ej., un fago específico de *Listeria*, un promotor tardío T4, T7 o Vil con un sistema basado en T4, T7 o Vil) puede garantizar además la expresión óptima del resto de detección. El uso de un promotor bacteriano estándar (no de virus/no de bacteriófago) puede en algunas realizaciones ser perjudicial para la expresión, ya que estos promotores a menudo se regulan por disminución durante la infección por bacteriófagos (para que el bacteriófago priorice los recursos bacterianos para la producción de proteínas de fagos). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el fago se modifica por ingeniería genética preferiblemente para codificar y expresar a un nivel alto un resto indicador soluble (libre), utilizando un lugar en el genoma que no limite la expresión al número de subunidades de un componente estructural del fago.

[0144] Las composiciones utilizadas en los métodos y sistemas de la invención pueden comprender uno o más bacteriófagos de tipo salvaje o modificados genéticamente (por ejemplo, bacteriófagos) y uno o más genes indicadores. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir cócteles de diferentes fagos indicadores que pueden codificar y expresar las mismas o distintas proteínas indicadoras. En algunas realizaciones, el cóctel de bacteriófagos comprende al menos dos tipos diferentes de bacteriófagos recombinantes.

Dispositivos o aparatos para detectar microorganismos

[0145] Las realizaciones de la invención se refieren a métodos para detectar microorganismos de interés utilizando un aparato autónomo. En algunas realizaciones, el aparato comprende un soporte sólido, que puede utilizarse para recolectar una muestra que comprende los microorganismos de interés. En algunas realizaciones, un aparato según la invención comprende un tubo con compartimentos separados, dispuestos secuencialmente o en configuración ramificada (por ejemplo, “orejas” en un tubo). El aparato puede comprender varios compartimentos que pueden configurarse para una mezcla variada de reactivos y la temporización de las etapas del método. El aparato comprende al menos dos compartimentos. En algunas realizaciones, el compartimento superior o superior del tubo contiene bacteriófagos recombinantes, y el compartimento de sustrato está debajo del compartimento bacteriófago.

[0146] El aparato comprende al menos dos compartimentos, incluido un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante que tiene un constructo genético insertado en un genoma de bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen indicador; un orificio de entrada en el primer compartimento para añadir al menos una parte de una muestra de ensayo al bacteriófago recombinante; y un segundo compartimento que comprende un sustrato o revelador, en donde el sustrato o revelador permite la detección del gen indicador (indicador).

[0147] En un ejemplo, un primer compartimento contiene un bacteriófago recombinante y un segundo compartimento contiene un sustrato o reactivo de revelado. En algunas de estas realizaciones, ambos reactivos se mezclan con una muestra al mismo tiempo. En otros casos, se añade inicialmente una muestra al primer compartimento para iniciar la infección. Después de un período de tiempo, se abre un conducto que conduce al segundo compartimento para permitir la adición y la mezcla del sustrato o reactivo revelador en la muestra infectada.

[0148] En una realización alternativa, el primer compartimento contiene un agente infeccioso liofilizado (por ejemplo, un bacteriófago recombinante liofilizado) y un segundo compartimento contiene un sustrato o reactivo de revelado. En algunas de estas realizaciones, ambos reactivos se mezclan con una muestra (opcionalmente, en donde los microorganismos de la muestra se capturan en un soporte sólido) al mismo tiempo. En otras realizaciones, se añade inicialmente una muestra al primer compartimento. Después de un período de tiempo, se abre un conducto que conduce al segundo compartimento para permitir la adición y la mezcla del sustrato o reactivo revelador en la muestra infectada.

[0149] En algunas realizaciones, un sello separa los compartimentos adyacentes, el usuario rompe el o los sellos y tanto el sustrato como el fago se encuentran con el hisopo al mismo tiempo, a medida que la luciferasa se produce y reacciona con el sustrato para producir una señal detectable.

[0150] El dispositivo no comprende un compartimento de medio y el dispositivo está exento de medio. Cuando un usuario rompe el sello para aplicar un reactivo a una muestra capturada en el soporte sólido, ambos reactivos pueden aplicarse al mismo tiempo.

[0151] El dispositivo no comprende un compartimento de medio y el dispositivo está exento de medio. Cuando un usuario rompe el sello para aplicar un reactivo a una muestra capturada en el soporte sólido, ambos reactivos pueden aplicarse al mismo tiempo.

[0152] En algunas realizaciones, se añade un soporte sólido a un tubo donde el sustrato o reactivo de revelado está en la parte inferior del tubo; el soporte sólido se empuja hacia el fondo para comenzar la reacción entre la

enzima y el sustrato u otro marcador y reactivo emparejado. El soporte sólido puede estar unido a un eje para facilitar su manejo.

5 [0153] En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una perla recubierta con una molécula que captura específicamente el microorganismo de interés (por ejemplo, un anticuerpo o una proteína de unión a células). En otras realizaciones, el soporte sólido comprende un hisopo u otro mecanismo de captura no específico.

[0154] Las siguientes figuras proporcionan ejemplos ilustrativos de realizaciones de la invención.

10 [0155] Las Figuras 11A, 11B y 11C muestran una realización de un aparato 100. Las realizaciones de las Figuras 11A y 11B no forman parte de la invención. El aparato comprende un soporte sólido 16 y un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada uno de los compartimentos está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento 10 contiene fagos, el segundo compartimento 12 contiene sustrato y el tercer compartimento 14 contiene medios. Este aparato permite incubar el fago y el sustrato con la muestra al mismo tiempo. En las realizaciones de la invención, el dispositivo está exento de medio (Figura 11C).

15 [0156] Las Figuras 12A, 12B y 12C muestran una segunda realización de un aparato 200. Las realizaciones de las Figuras 12A y 12B no forman parte de la invención. El aparato comprende un soporte sólido 26 y un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada uno de los compartimentos está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento 20 contiene fagos, el segundo compartimento 22 contiene medios y el tercer compartimento 24 contiene sustrato. En realizaciones que no forman parte de la invención, utilizando el aparato representado en la Figura 12A, la muestra se incuba primero con el fago, antes de la incubación con el sustrato. En otras realizaciones que utilizan el aparato representado en la Figura 12B, el soporte sólido se empapa con medio antes de la recogida de la muestra. En las realizaciones de la invención, el dispositivo está exento de medio (Figura 12C).

20 [0157] Las Figuras 13A, 13B y 13C representan una tercera realización de un aparato 300. Las realizaciones de las Figuras 13A y 13B no forman parte de la invención. El aparato comprende un soporte sólido 36 y un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada uno de los compartimentos está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento 30 contiene medios, el segundo compartimento 32 contiene fagos y el tercer compartimento 34 contiene sustrato. En realizaciones que no forman parte de la invención, utilizando el aparato representado en la Figura 13A, la muestra se incuba primero con el fago, antes de la incubación con el sustrato. En otras realizaciones, que no forman parte de la invención, utilizando el aparato representado en la Figura 13B, el soporte sólido se seca antes de la recogida de la muestra. En las realizaciones de la invención, el dispositivo está exento de medio (Figura 13C).

25 [0158] Las Figuras 14A, 14B, 14C muestran una cuarta realización de un aparato 400. Las realizaciones de las Figuras 14A y 14B no forman parte de la invención. El aparato comprende un soporte sólido 46 y un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada uno de los compartimentos está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento 40 contiene medios, el segundo compartimento 42 contiene fagos y el tercer compartimento 46 contiene sustrato. El aparato tiene un mecanismo de bloqueo para mezclar los reactivos por fases. En realizaciones que no forman parte de la invención, utilizando el aparato representado en la Figura 14A, la muestra se incuba primero con el fago, antes de la incubación con el sustrato. En otras realizaciones, que no forman parte de la invención, utilizando el aparato representado en la Figura 14B, el soporte sólido se empapa con medio antes de la recogida de la muestra. En las realizaciones de la invención, el dispositivo está exento de medio (Figura 14C).

30 [0159] Las Figuras 15A, 15B y 15C representan una quinta realización de un aparato 500. Las realizaciones de las Figuras 15A y 15B no forman parte de la invención. El aparato comprende un soporte sólido 56 y un recipiente que comprende tres compartimentos. Cada uno de los compartimentos está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento 50 contiene medios, el segundo compartimento 52 contiene fagos y el tercer compartimento 54 contiene sustrato. El aparato tiene un mecanismo de bloqueo para mezclar los reactivos por fases. En realizaciones que no forman parte de la invención, utilizando el aparato representado en la Figura 15A, la muestra se incuba primero con el fago, antes de la incubación con el sustrato. En otras realizaciones, que no forman parte de la invención, utilizando el aparato representado en la Figura 15B, el soporte sólido se seca antes de la recogida de la muestra. En las realizaciones de la invención, el dispositivo está exento de medio (Figura 15C).

35 [0160] La Figura 16 representa una sexta realización de un aparato 600. El aparato comprende un soporte sólido 64 y un recipiente que comprende dos compartimentos. Cada uno de los compartimentos está separado por un sello de acción rápida. El primer compartimento 60 contiene fagos y el segundo compartimento 62 contiene sustrato. En unas realizaciones, utilizando el aparato representado en la Figura 16, la muestra se incuba primero con el fago, antes de la incubación con el sustrato.

40 [0161] La Figura 17 representa una realización de un método para detectar microorganismos que comprende (i) enriquecer una muestra durante la noche, (ii) utilizar un soporte sólido de un aparato autónomo para recolectar la muestra que se ha enriquecido durante la noche, (iii) infectar la muestra con fagos contenidos dentro de un compartimento del aparato autónomo y (iv) detectar la presencia de microorganismos leyendo/detectando la señal producida por la etapa de infección.

[0162] En algunas realizaciones, los compartimentos contenidos en proyecciones o ramificaciones del tubo central permiten mezclar los reactivos desde más de 2 direcciones, por ejemplo, en forma de “orejas”. Por ejemplo, podrían utilizarse dos perillas de compresión para añadir medios y luego fagos de forma secuencial o simultánea al compartimento principal, o para añadir otros reactivos. Diversas disposiciones de otros compartimentos con respecto a un compartimento central permiten la adición y mezcla de diferentes reactivos en el compartimento adyacente más grande.

Métodos de uso del aparato para detectar microorganismos

[0163] Como se indica en la presente memoria, en ciertas realizaciones, la invención puede incluir métodos para detectar el microorganismo tal como se define en las reivindicaciones, método que comprende poner en contacto la muestra con un soporte sólido de modo que los microorganismos se capturen en el soporte sólido, poner en contacto el bacteriófago recombinante del primer compartimento con los microorganismos capturados en el soporte sólido, por ejemplo, rompiendo un sello de acción rápida del primer compartimento. Durante y/o después de la infección, los bacteriófagos expresan el gen indicador para producir un indicador, que puede detectarse mediante diversos dispositivos de detección. En algunas realizaciones, la detección del indicador puede requerir la adición de un sustrato, que reacciona con el indicador para producir una señal detectable. La presencia de las señales indica la presencia de los microorganismos en la muestra.

[0164] En una realización alternativa, la invención puede incluir métodos para detectar el microorganismo como se define en las reivindicaciones, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un soporte sólido de modo que los microorganismos se capturen en el soporte sólido, poner en contacto el bacteriófago recombinante del primer compartimento con los microorganismos capturados en el soporte sólido, por ejemplo, rompiendo un sello de acción rápida del primer compartimento. El resto indicador del bacteriófago recombinante puede detectarse mediante diversos dispositivos de detección. En algunas realizaciones, la detección del indicador puede requerir la adición de un sustrato, que reacciona con el indicador para producir una señal detectable. La presencia de las señales indica la presencia de los microorganismos en la muestra.

Toma de muestras

[0165] En algunas realizaciones, las muestras pueden utilizarse directamente en los métodos de detección de la presente invención, sin preparación, concentración o dilución. Por ejemplo, las muestras líquidas, que incluyen, aunque no de forma limitativa, leche y zumos, pueden analizarse directamente. En otras realizaciones, las muestras pueden diluirse o suspenderse en solución, que puede incluir, aunque no de forma limitativa, una solución tamponada o un medio de cultivo bacteriano. Una muestra que sea sólida o semisólida puede suspenderse en un líquido picando, mezclando o macerando el sólido en el líquido. En algunas realizaciones, una muestra debe mantenerse dentro de un intervalo de pH que promueva la unión del fago a la célula bacteriana hospedadora. En algunas realizaciones, el intervalo de pH preferido puede ser uno adecuado para el bacteriófago unido a una célula bacteriana. Una muestra también debe contener las concentraciones apropiadas de cationes divalentes y monovalentes, incluidos, entre otros, Na⁺, Mg²⁺ y K⁺.

[0166] Preferiblemente durante los ensayos de detección, la muestra se mantiene a una temperatura que mantenga la viabilidad de cualquier célula patógena presente en la muestra. Durante las etapas en las que los bacteriófagos se unen a las células bacterianas, es preferible mantener la muestra a una temperatura que facilite la actividad de los bacteriófagos. Dichas temperaturas son de al menos aproximadamente 25 °C y no más de aproximadamente 45 °C. En algunas realizaciones, las muestras se mantienen a aproximadamente 37 °C. En algunas realizaciones, las muestras se someten a una mezcla o agitación suave durante la unión o fijación de los bacteriófagos.

[0167] Los ensayos pueden incluir varias muestras de control apropiadas. Por ejemplo, las muestras de control, por ejemplo, muestras de alimentos sin bacterias, pueden ensayarse como controles para determinar los niveles de señal de fondo.

[0168] La toma de muestras puede hacerse de diversas formas. En algunas realizaciones, las muestras, por ejemplo, las muestras de alimentos, se licuan primero y el soporte sólido, por ejemplo, el soporte sólido o la perla, se sumerge en la muestra líquida. En algunas realizaciones, el soporte sólido se empapa primero en el medio de cultivo del tubo antes de la toma de muestras. En algunas realizaciones, el soporte sólido se seca antes de la toma de muestras. En algunas realizaciones, la muestra líquida se cultiva primero durante un período de tiempo (“enriquecimiento del cultivo”), por ejemplo, menos de 24 horas, menos de 12 horas, menos de un período de enriquecimiento de 9 horas o menos, 8 horas o menos, 7 horas o menos, 6 horas o menos, 5 horas o menos, 4 horas o menos, 3 horas o menos, o 2 horas o menos.

[0169] En otras realizaciones, la muestra puede enriquecerse después de la captura de los microorganismos en el soporte sólido. Esta etapa se denomina enriquecimiento por incubación. En tales casos, el período de enriquecimiento puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o hasta 8 horas o más, dependiendo del tipo y tamaño de la muestra.

[0170] En algunas realizaciones de los métodos de la invención, los microorganismos pueden detectarse sin ningún aislamiento o purificación de los microorganismos de una muestra. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una muestra que contenga uno o más microorganismos de interés puede aplicarse directamente al soporte sólido y el ensayo se lleva a cabo en el aparato.

Infección

[0171] Los métodos descritos en la presente memoria comprenden hacer funcionar el aparato para hacer que el bacteriófago recombinante entre en contacto con los microorganismos de interés. Al entrar en contacto con los microorganismos, el bacteriófago se replica y expresa el gen indicador o el gen marcador. Consulte la sección titulada “Bacteriófagos recombinantes”. El tiempo de infección, es decir, un período de tiempo entre el punto de tiempo en donde la muestra se pone en contacto por primera vez con el bacteriófago y el punto de tiempo en donde se añade el sustrato a la mezcla, puede variar, según el tipo de bacteriófago y la concentración de los microorganismos en la muestra. El uso del aparato en donde las bacterias se capturan en un soporte sólido puede reducir significativamente el tiempo requerido para la infección, por ejemplo, el tiempo de infección puede ser de una hora o menos, mientras que en un ensayo estándar, en donde no se utiliza un soporte sólido para capturar la bacteria, la infección es de forma típica de al menos 4 horas. En ciertas realizaciones, el tiempo de infección para los métodos descritos en la presente memoria es inferior a 6,0 horas, 5,0 horas, 4,0 horas, 3,0 horas, 2,5 horas, 2,0 horas, 1,5 horas, 1,0 hora, 45 minutos o menos de 30 minutos. En algunas realizaciones, el tiempo de infección es de aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas o aproximadamente 3 horas.

Desarrollo de una señal

[0172] El indicador, producido por la expresión del gen indicador, puede detectarse utilizando métodos bien conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, uno o más componentes productores de señales pueden reaccionar con el indicador para generar una señal detectable. En algunas realizaciones, el indicador puede ser un compuesto bioluminiscente. Si el indicador es una enzima, entonces la amplificación de la señal detectable se obtiene haciendo reaccionar la enzima con uno o más sustratos o enzimas y sustratos adicionales para producir un producto de reacción detectable. En un sistema productor de señales alternativo, el indicador puede ser un compuesto fluorescente en donde no se requiere ninguna manipulación enzimática del indicador para producir la señal detectable. Moléculas fluorescentes que incluyen, por ejemplo, fluoresceína y rodamina y sus derivados y análogos, son adecuadas para su uso como indicadores en tal sistema. En otra realización alternativa, el resto indicador puede ser un cofactor, a continuación se obtiene la amplificación de la señal detectable haciendo reaccionar el cofactor con la enzima y uno o más sustratos o enzimas y sustratos adicionales para producir un producto de reacción detectable. En algunas realizaciones, la señal detectable es colorimétrica. Se observa que la selección de un indicador particular no es crítica para la presente invención, pero el indicador será capaz de generar una señal detectable por sí mismo, o ser detectable instrumentalmente, o ser detectable junto con uno o más componentes productores de señales adicionales, tales como un sistema productor de señales de enzima/sustrato.

[0173] En algunas realizaciones, la etapa de detección requerirá la adición de un sustrato sobre el que actúe la enzima indicadora. El sustrato puede añadirse de diversas formas. En algunas realizaciones, el sustrato está comprendido en el segundo compartimento del aparato y romper el sello de acción rápida hace que el fago (en el primer compartimento del aparato) y el sustrato entren en contacto con los microorganismos (capturados en el soporte sólido) simultáneamente. Véase la **Figura 12**. En algunas realizaciones, los sellos de acción rápida se rompen secuencialmente, lo que hace que los microorganismos entren en contacto con el bacteriófago antes de entrar en contacto con el sustrato. Véanse las **Figuras 13A** y **13B**. En algunas realizaciones, el método comprende hacer funcionar el dispositivo de cierre para permitir la mezcla por fases de modo que los microorganismos entren en contacto con el bacteriófago antes de entrar en contacto con el sustrato.

[0174] En algunas realizaciones, la reacción del indicador (por ejemplo, la luciferasa) con el sustrato puede continuar durante 30 minutos o más, y la detección en varios puntos temporales puede ser deseable para optimizar la sensibilidad. En algunas realizaciones, las lecturas del luminómetro pueden tomarse inicialmente y a intervalos de 3, 5, 10 o 15 minutos hasta que se complete la reacción.

Detección de la señal

[0175] La detección de la señal producida por el indicador puede incluir la detección de la emisión de luz. En algunas realizaciones, el compartimento del aparato en donde se mezcla el sustrato con la muestra de ensayo es transparente, de modo que cualquier señal resultante de la infección y la posterior incubación con el sustrato es visible. En este caso, la señal puede detectarse a través de la pared del compartimento. En algunas realizaciones, el aparato que contiene la muestra reaccionada se inserta en un instrumento para detectar la señal resultante. En otras realizaciones, se utiliza un instrumento de detección para escanear el aparato que contiene la muestra reaccionada.

[0176] En algunas realizaciones, un luminómetro puede ser utilizado para detectar el indicador (por ejemplo, luciferasa), como el GloMax® 20/20 y el GloMax® de Promega (Madison, WI). En algunas realizaciones, puede

utilizarse un espectrofotómetro, una cámara CCD o una cámara CMOS para detectar cambios de color y otras emisiones de luz. Las ULR absolutas son importantes para la detección, pero la relación señal/fondo también debe ser alta (por ejemplo, $> 2,0$, $> 2,5$ o $> 3,0$) para que se detecten de forma fiable las células individuales o un número reducido de células. La señal de fondo puede obtenerse midiendo la muestra de control que no contiene microorganismos utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la detección de la señal del gen indicador o marcador puede incluir, por ejemplo, el uso de un instrumento que emplea la tecnología de fotodiodos o PMT (tubo fotomultiplicador). En algunas realizaciones, puede emplearse un luminómetro portátil para la detección de la señal. Luminómetros portátiles PMT adecuados son los comercializados por 3M (Maplewood, MN), BioControl (Seattle, WA) y Charm Science (Lawrence, MA). Luminómetros portátiles de fotodiodo adecuados son los comercializados por Hygiene (Camarillo, CA) y Neogen (Lansing, MI). Estos luminómetros portátiles suelen producir lecturas mucho más bajas en comparación con los luminómetros tradicionales (GloMax o GloMax 20/20) para la misma muestra. Como se muestra en los ejemplos, múltiples experimentos muestran que las señales producidas por las reacciones eran suficientes para ser detectadas por estos luminómetros portátiles. Los ensayos se repitieron varias veces con diferentes tipos de microorganismos, incluidos *L. monocytogenes* y *Salmonella*, y se obtuvieron resultados similares cada vez. Esto indica que el método de detección que utiliza el aparato es suficientemente sensible y robusto. La posibilidad de utilizar estos dispositivos portátiles para detectar el microorganismo también ofrece la comodidad y la flexibilidad de las que a menudo carecen los métodos de detección que utilizan dispositivos de detección tradicionales no portátiles.

20 Sistemas de la invención

[0177] En algunas realizaciones, la invención comprende sistemas (por ejemplo, sistemas automatizados) que comprenden componentes para realizar los métodos descritos en la presente memoria como se definen en las reivindicaciones. Los métodos descritos en la presente memoria también pueden utilizar dichos sistemas. Algunas realizaciones descritas en la presente memoria son especialmente adecuadas para la automatización, dada la cantidad mínima de reactivos y materiales requerida para llevar a cabo los métodos. En ciertas realizaciones, cada uno de los componentes puede comprender una unidad autónoma que puede llevarse de un primer sitio a un segundo sitio.

[0178] En algunas realizaciones, la invención comprende sistemas para la detección rápida de un microorganismo de interés en una muestra como se define en las reivindicaciones. Los sistemas comprenden: un aparato como el descrito anteriormente y un componente de detección de señales, en donde el componente de detección de señales puede detectar el producto del gen indicador producido al infectar la muestra con el bacteriófago recombinante. En algunas realizaciones, el componente de detección de señales es un dispositivo portátil. En algunas realizaciones, el componente de detección de señales es un luminómetro portátil.

[0179] Por lo tanto, la invención comprende un sistema para la detección rápida de un microorganismo de interés en una muestra, que comprende: un aparato que comprende: un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante que tiene un constructo genético insertado en un genoma de bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen indicador. El sistema o kit puede comprender además un segundo compartimento que contiene sustrato y/o un tercer compartimento que contiene medios. Uno o más de estos compartimentos están sellados y separados de la otra parte del aparato mediante un sello de acción rápida, y la ruptura del sello de acción rápida hace que el contenido del compartimento salga del compartimento y se mezcle con la muestra.

[0180] En algunas realizaciones, el sistema puede comprender un componente para aislar el microorganismo de interés de los otros componentes de la muestra.

[0181] En algunos sistemas, puede utilizarse el mismo componente para varias etapas. En algunos sistemas, las etapas son automatizadas o controladas por el usuario mediante una entrada de ordenador y/o en donde un robot de manipulación de líquidos realiza al menos una etapa. En un sistema computarizado, el sistema puede estar completamente automatizado, semiautomatizado o dirigido por el usuario a través de un ordenador (o alguna combinación de los mismos).

[0182] Estos sistemas de la invención incluyen varios componentes. Como se utiliza en la presente memoria, el término "componente" se define ampliamente e incluye cualquier aparato adecuado o conjunto de aparatos adecuados para llevar a cabo el método mencionado. Los componentes no necesitan estar conectados o situados de forma integral unos con respecto a otros de ninguna forma particular. La invención incluye cualquier disposición adecuada de los componentes entre sí. Por ejemplo, no es necesario que los componentes estén en la misma sala. Sin embargo, en algunas realizaciones, los componentes están conectados entre sí en una unidad integral. En algunas realizaciones, los mismos componentes pueden realizar múltiples funciones.

Sistemas informáticos y medios legibles por ordenador

[0183] En ciertas realizaciones, la invención puede comprender un sistema. El sistema puede incluir al menos algunas de las composiciones de la invención. Además, el sistema puede comprender al menos algunos de los

componentes para realizar el método. En ciertas realizaciones, el sistema se formula como un kit. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención puede comprender un sistema para la detección rápida de un microorganismo de interés en una muestra. El sistema puede incluir al menos algunas de las composiciones de la invención. Además, el sistema puede comprender al menos algunos de los componentes para realizar el método. En ciertas realizaciones, el sistema se formula como un kit. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención puede comprender un sistema para la detección rápida de un microorganismo de interés en una muestra, que comprende un aparato como el descrito anteriormente. Por ejemplo, el aparato puede comprender un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante que tiene un constructo genético insertado en un genoma de bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen indicador; en donde el soporte sólido comprende un componente de unión celular. En algunas realizaciones, el sistema también comprende un dispositivo de detección portátil.

[0184] El sistema, tal como se describe en la presente técnica o cualquiera de sus componentes, se puede incorporar en forma de un sistema informático. Ejemplos típicos de un sistema informático incluyen un ordenador de uso general, un microprocesador programado, un microcontrolador, un elemento de circuito integrado periférico y otros dispositivos o disposiciones de dispositivos que son capaces de ejecutar las etapas que constituyen el método de la presente técnica.

[0185] Un sistema informático puede comprender un ordenador, un dispositivo de entrada, una unidad de visualización y/o Internet. El ordenador puede comprender además un microprocesador. El microprocesador puede estar conectado a un bus de comunicación. El ordenador también puede incluir una memoria. La memoria puede incluir una memoria de acceso aleatorio (RAM) y una memoria de solo lectura (ROM). El sistema informático puede comprender además un dispositivo de almacenamiento. El dispositivo de almacenamiento puede ser una unidad de disco duro o una unidad de almacenamiento extraíble, tal como una unidad de disquete, una unidad de disco óptico, etc. El dispositivo de almacenamiento también puede ser otro medio similar para cargar programas informáticos u otras instrucciones en el sistema informático. El sistema informático también puede incluir una unidad de comunicación. La unidad de comunicación permite que el ordenador se conecte a otras bases de datos y a Internet a través de una interfaz de E/S. La unidad de comunicación permite la transferencia a, así como la recepción de datos de, otras bases de datos. La unidad de comunicación puede incluir un módem, una tarjeta Ethernet o cualquier dispositivo similar que permita al sistema informático conectarse a bases de datos y redes tales como LAN, MAN, WAN e Internet. Por lo tanto, el sistema informático puede facilitar las entradas de un usuario a través de un dispositivo de entrada, accesible al sistema a través de la interfaz de E/S.

[0186] Un dispositivo informático incluirá de forma típica un sistema operativo que proporciona instrucciones de programa ejecutables para la administración y el funcionamiento general de ese dispositivo informático, y normalmente incluirá un medio de almacenamiento legible por ordenador (por ejemplo, un disco duro, una memoria de acceso aleatorio, una memoria de solo lectura, etc.) que almacena instrucciones que, cuando son ejecutadas por un procesador del servidor, permiten al dispositivo informático realizar las funciones previstas. Se conocen ejecuciones adecuadas para el sistema operativo y la funcionalidad general del dispositivo informático o se comercializan, y son fácilmente ejecutadas por personas con experiencia ordinaria en la técnica, especialmente a la luz de la descripción en la presente memoria.

[0187] El sistema informático ejecuta un conjunto de instrucciones que se almacenan en uno o más elementos de almacenamiento, para procesar los datos de entrada. Los elementos de almacenamiento también pueden contener datos u otra información, según se desee. El elemento de almacenamiento puede tener la forma de una fuente de información o un elemento de memoria física presente en la máquina de procesamiento.

[0188] El entorno puede incluir una variedad de almacenes de datos y otros medios de memoria y almacenamiento, como se ha explicado anteriormente. Pueden residir en una variedad de localizaciones, como en un medio de almacenamiento local (o residente en) uno o más de los equipos o de forma remota desde cualquiera o todos los equipos de la red. En un conjunto particular de realizaciones, la información puede residir en una red de área de almacenamiento ("SAN") familiar para los expertos en la técnica. Del mismo modo, cualquier archivo necesario para realizar las funciones atribuidas a los ordenadores, servidores u otros dispositivos de red puede almacenarse de forma local y/o remota, según corresponda. Cuando un sistema incluye dispositivos informáticos, cada uno de estos dispositivos puede incluir elementos de hardware que pueden acoplarse eléctricamente a través de un bus, los elementos incluyen, por ejemplo, al menos una unidad central de procesamiento (CPU), al menos un dispositivo de entrada (por ejemplo, un ratón, un teclado, un controlador, una pantalla táctil o un teclado) y al menos un dispositivo de salida (por ejemplo, un dispositivo de visualización, una impresora o un altavoz). Dicho sistema también puede incluir uno o más dispositivos de almacenamiento, tales como unidades de disco, dispositivos de almacenamiento óptico y dispositivos de almacenamiento de estado sólido, tales como memoria de acceso aleatorio ("RAM") o memoria de solo lectura ("ROM"), así como dispositivos multimedia extraíbles, tarjetas de memoria, tarjetas flash, etc.

[0189] Dichos dispositivos también pueden incluir un lector de medios de almacenamiento legible por ordenador, un dispositivo de comunicaciones (por ejemplo, un módem, una tarjeta de red (inalámbrica o cableada), un dispositivo de comunicación por infrarrojos, etc.) y una memoria de trabajo como se ha descrito anteriormente. El lector de medios de almacenamiento legibles por ordenador puede conectarse con, o configurarse para recibir, un

medio de almacenamiento legible por ordenador, que representa dispositivos de almacenamiento remotos, locales, fijos y/o extraíbles, así como medios de almacenamiento para contener, almacenar, transmitir y recuperar de forma temporal y/o más permanente información legible por ordenador. El sistema y los diversos dispositivos también incluirán normalmente una serie de aplicaciones de software, módulos, servicios u otros elementos localizados en al menos un dispositivo de memoria de trabajo, incluidos un sistema operativo y programas de aplicación, tales como una aplicación cliente o un navegador web. Debe apreciarse que las realizaciones alternativas pueden tener numerosas variaciones con respecto a las descritas anteriormente. Por ejemplo, también puede utilizarse hardware personalizado y/o pueden incorporarse elementos particulares en hardware, software (incluido software portátil, como applets) o ambos. Además, puede emplearse la conexión a otros dispositivos informáticos, tales como dispositivos de entrada/salida de red.

[0190] Los medios de almacenamiento no transitorios y los medios legibles por ordenador para contener código, o partes de código, pueden incluir cualquier medio apropiado conocido o utilizado en la técnica, incluidos medios de almacenamiento y medios de comunicación, tales como, entre otros, medios volátiles y no volátiles, extraíbles y no extraíbles ejecutados en cualquier método o tecnología para el almacenamiento y/o la transmisión de información, como instrucciones legibles por ordenador, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos, incluidos RAM, ROM, EEPROM, memoria flash u otra tecnología de memoria, CD-ROM, disco versátil digital (DVD) u otro dispositivo de almacenamiento óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético, o cualquier otro medio que pueda utilizarse para almacenar la información deseada y al que pueda accederse mediante un dispositivo del sistema. Basándose en la descripción y en los principios proporcionados en la presente memoria, un experto en la técnica apreciará otras formas y/o métodos para ejecutar las diversas realizaciones.

[0191] Un medio legible por ordenador puede comprender, aunque no de forma limitativa, un dispositivo de almacenamiento electrónico, óptico, magnético u otro capaz de proporcionar a un procesador instrucciones legibles por ordenador. Otros ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, disquete, CD-ROM, DVD, disco magnético, chip de memoria, ROM, RAM, SRAM, DRAM, memoria direccionable por contenido (“CAM”), DDR, memoria flash como flash NAND o NOR, un ASIC, procesador configurado, almacenamiento óptico, cinta magnética u otro medio de almacenamiento magnético, o cualquier otro medio desde el que un procesador de ordenador pueda leer instrucciones. En una realización el dispositivo informático puede comprender un único tipo de medio legible por ordenador, tal como una memoria de acceso aleatorio (RAM). En otras realizaciones, el dispositivo informático puede comprender dos o más tipos de medios legibles por ordenador, tales como una memoria de acceso aleatorio (RAM), una unidad de disco y una memoria caché. El dispositivo informático puede estar en comunicación con uno o más medios externos legibles por ordenador, tales como una unidad de disco duro externa o una unidad de DVD o Blu-Ray externa.

[0192] Como se ha descrito anteriormente, la realización comprende un procesador que está configurado para ejecutar instrucciones de programa ejecutables por ordenador y/o para acceder a la información almacenada en la memoria. Las instrucciones pueden comprender instrucciones específicas del procesador generadas por un compilador y/o un intérprete a partir de código escrito en cualquier lenguaje de programación de ordenador adecuado, incluyendo, por ejemplo, C, C++, C#, Visual Basic, Java, Python, Perl, JavaScript y ActionScript (Adobe Systems, Mountain View, California). En una realización, el dispositivo informático comprende un único procesador. En otras realizaciones, el dispositivo comprende dos o más procesadores. Dichos procesadores pueden comprender un microprocesador, un procesador de señales digitales (DSP), un circuito integrado de aplicación específica (ASIC), matrices de puertas programables en campo (FPGA) y máquinas de estado. Dichos procesadores pueden comprender además dispositivos electrónicos programables tales como PLC, controladores de interrupción programables (PIC), dispositivos lógicos programables (PLD), memorias de solo lectura programables (PROM), memorias de solo lectura programables electrónicamente (EPROM o EEPROM) u otros dispositivos similares.

[0193] El dispositivo informático comprende una interfaz de red. En algunas realizaciones, la interfaz de red está configurada para comunicarse a través de enlaces de comunicación cableados o inalámbricos. Por ejemplo, la interfaz de red puede permitir la comunicación a través de redes a través de Ethernet, IEEE 802.11 (Wi-Fi), 802.16 (Wi-Max), Bluetooth, infrarrojos, etc. Como otro ejemplo, la interfaz de red puede permitir la comunicación a través de redes tales como CDMA, GSM, UMTS u otras redes de comunicación celular. En algunas realizaciones, la interfaz de red puede permitir conexiones punto a punto con otro dispositivo, por ejemplo, a través del bus serie universal (USB), FireWire 1394, conexiones en serie o en paralelo, o interfaces similares. Algunas realizaciones de dispositivos informáticos adecuados pueden comprender dos o más interfaces de red para la comunicación a través de una o más redes. En algunas realizaciones, el dispositivo informático puede incluir un almacén de datos además de, o en vez de, una interfaz de red.

[0194] Algunas realizaciones de dispositivos informáticos adecuados pueden comprender, o estar en comunicación con, varios dispositivos externos o internos, tales como un ratón, un CD-ROM, un DVD, un teclado, una pantalla, altavoces de audio, uno o más micrófonos o cualquier otro dispositivo de entrada o salida. Por ejemplo, el dispositivo informático puede estar en comunicación con varios dispositivos de interfaz de usuario y una pantalla. La pantalla puede utilizar cualquier tecnología adecuada que incluye, aunque no de forma limitativa, LCD, LED, CRT y similares.

[0195] El conjunto de instrucciones para su ejecución por el sistema informático puede incluir varios comandos que ordenan a la máquina de procesamiento que realice tareas específicas, tales como las etapas que constituyen el método de la presente técnica. El conjunto de instrucciones puede ser en forma de un programa de software. Además, el software puede ser en forma de una colección de programas separados, un módulo de programa con un programa más grande o una parte de un módulo de programa, como en la presente técnica. El software también puede incluir programación modular en forma de programación orientada a objetos. El procesamiento de los datos de entrada por parte de la máquina de procesamiento puede ser en respuesta a las órdenes del usuario, los resultados del procesamiento anterior o una solicitud realizada por otra máquina de procesamiento.

Ejemplos

[0196] Los siguientes ejemplos describen la detección de un número bajo de células, incluso de una sola bacteria, en un tiempo reducido hasta la obtención de resultados y tienen por objeto ilustrar, pero no limitar, la invención. Los ejemplos que no caen dentro del ámbito de las reivindicaciones se proporcionan con fines ilustrativos únicamente.

Ejemplo 1. Detección de microorganismos de interés en cultivos bacterianos

[0197] Este ejemplo demuestra el rendimiento del método de detección que utiliza el aparato con la detección exitosa de bacterias presentes en un cultivo bacteriano.

Montaje del aparato

[0198] Se añadieron 100 μ l de cóctel de fagos A511/P100 ($1,2 \times 10^9$ Pfu/ml) y 100 μ l de medio BHI +1 mM de CaCl_2 en el bulbo superior del aparato (primer compartimento). El fago A511/p100 es un fago que ataca a *Listeria monocytogenes*. Se utilizó una prensa de soporte sólido para unir los componentes superiores del aparato. El tubo del aparato fue llenado con 900 μ l de medio BHI + 1 mM de CaCl_2 . El soporte sólido se colocó entonces en el tubo del aparato para absorber parte del medio. El aparato ensamblado (que contenía un soporte sólido empapado en medio) se mantuvo luego durante la noche a 4 °C.

Crecimiento del cultivo de bacterias

[0199] *Listeria monocytogenes* se cultivó durante la noche en medio BHI (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE. UU.) en una incubadora con agitación. El cultivo durante la noche se subcultivó luego en medio BHI hasta la fase logarítmica a 37 °C. Las células de fase logarítmica se diluyeron después hasta el número apropiado de células (véase la Figura 2). El soporte sólido se retiró del aparato y los cultivos diluidos se colocaron sobre el soporte sólido a los niveles de UFC indicados. El soporte sólido que se enriqueció únicamente con bacterias o medios (control) se puso de nuevo en el tubo del aparato y el tubo se agitó suavemente para mezclar el contenido. (Figura 2, Tabla 1)

[0200] En un experimento similar, 2 soportes sólidos se enriquecieron con 10 UFC para cada una de las bacterias. Se utilizó una muestra no inoculada como control. Estas muestras se incubaron durante la noche a 35 °C para expandir el número de bacterias antes de la infección y la exposición al sustrato (Figura 2, Tabla 2).

Infección

[0201] Luego, la válvula de cierre se rompió sujetando firmemente el soporte sólido y rompiendo la válvula con el pulgar y el índice. El fago (200 μ l de 6×10^8 UFP/ml) se expulsó apretando el bulbo en la parte superior del tubo de soporte sólido. El contenido del tubo de soporte sólido se mezcló suavemente con agitación. El soporte sólido se puso luego en una incubadora a 30 °C durante 4 horas para la infección por fagos de las bacterias. El sustrato NanoGlo (Promega, Madison, WI) se diluyó 1:4 con etanol al 70 % y se añadieron 10 ml de sustrato diluido a un tubo de soporte sólido. El contenido del tubo del aparato se mezcló con vortex y luego se dejó reposar durante 3 minutos.

Detección

[0202] Se utilizaron tres métodos de detección. El tubo de soporte sólido se insertó en el luminómetro portátil Hygiene. Se retiró 1 ml de la mezcla de infección y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para su lectura en el luminómetro GloMax 20/20 ("GloMax 20/20"), y se transfirieron 150 μ l de la mezcla de infección a una placa de 96 pocillos para su lectura en el luminómetro GloMax ("GloMax"),

[0203] La detección se hizo luego con soportes sólidos que se remojaron en medios durante la noche, con un tiempo de infección de 2 horas. Los resultados se muestran en la Figura 2, Tablas 1 y 2, y las representaciones gráficas de los resultados se muestran en las Figuras 3A y 3B. Los resultados muestran que sin enriquecimiento del crecimiento (sin cultivo durante la noche de la muestra antes de capturarla con el soporte sólido), la prueba es lo suficientemente sensible como para detectar 25.000 UFC en un luminómetro portátil de Hygiene (FIG. 3A) -las lecturas de las muestras inoculadas con bacterias estaban todas por encima del umbral de detección de 10 unidades

de luminiscencia relativa (ULR), criterio para muestras positivas, y detectan aproximadamente 5.000 UFC en un GloMax 20/20 o un GloMax (FIG. 3B).

Ejemplo 2. Detección de Salmonella en muestra de pavo

Montaje del aparato

[0204] El aparato se montó como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el bulbo superior se llenó con 100 µl de cóctel de fagos SEA1/TSP1 ($1,2 \times 10^7$ UFP/ml) y 100 µl de medio TSB (ThermoFisher Oxoid, Grand Island, NY, EE. UU.) y el tubo del aparato se llenó con 1 ml de medio TSB. El fago SEA1/TSP1 es un fago que ataca a *Salmonella*.

Inoculación bacteriana de carne de pavo triturada

[0205] El cultivo de Salmonella se hizo crecer durante una noche y se diluyó para obtener muestras con alto y bajo contenido de UFC como se describe a continuación.

[0206] Las partes de ensayo de 25 g de carne picada de pavo se dividieron en tres grupos: grupo no inoculado (5 muestras), grupo muy inoculado (5 muestras) y grupo poco inoculado (20 muestras). Cada muestra de 25 g del grupo alto se inoculó con 2-10 UFC de *Salmonella*, y cada muestra del grupo bajo se inoculó con 0,2-2 UFC de *Salmonella*. Las muestras se pusieron a continuación en bolsas de muestras filtradas y se almacenaron a 4 °C durante 48-72 horas.

Enriquecimiento de bacterias en carne picada de pavo inoculada

[0207] Se añadió medio TSB precalentado (41 °C) a cada muestra en una proporción de muestra a medio de 1:3. A continuación, la muestra se mezcló en STOMACHER® durante 30 segundos a temperatura alta y, a continuación, se incubó a 41 °C sin agitar durante 24 horas para enriquecer las bacterias de la muestra.

Toma de muestras

[0208] La muestra de ensayo se obtuvo sumergiendo el soporte sólido en cada muestra enriquecida y haciendo girar durante 10 segundos para absorber la máxima cantidad de muestra. El soporte sólido se puso en el tubo del aparato lleno con medio TSB. El tubo se agitó suavemente para mezclar el contenido del tubo y, a continuación, se infectó inmediatamente o se puso a 37 °C durante una hora adicional antes de la infección.

Infección

[0209] La válvula de cierre del compartimento que alojaba el bacteriófago se rompió entonces sujetando firmemente el soporte sólido y rompiendo la válvula con el pulgar y el índice. El fago (200 µl de 6×10^6 Pfu/ml) fue expulsado hacia el tubo al apretar la perilla en la parte superior del tubo del aparato. El contenido del tubo del aparato se mezcló suavemente mediante agitación. El soporte sólido se puso luego en una incubadora a 37 °C durante 30 minutos o 2 horas para la infección por fagos de las bacterias. El sustrato NanoGlo (Promega, Madison, WI) se diluyó 1:4 con etanol al 70 % y se añadieron 10 ml de sustrato diluido al tubo del aparato. El contenido del tubo del aparato se mezcló con vortex y luego se dejó reposar durante 3 minutos. Las señales se detectaron como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados de las muestras no inoculadas (grupo de control) se muestran en la Figura 4, la Tabla 3 y las muestras inoculadas (grupo experimental) se muestran en la Tabla 4. La representación gráfica de los resultados se muestra en la Figura 5A y la Figura 5B.

[0210] Los resultados muestran que cada uno de los tres dispositivos de detección utilizados pudo detectar todas las muestras de pavo que dieron positivo para *Salmonella* después de un enriquecimiento del cultivo de 24 horas. La señal de GloMax y GloMax 20/20 fue mucho mayor que la de Hygiene Luminometer. El tiempo de incubación (es decir, la incubación del soporte sólido que ha capturado la bacteria con el medio antes de la infección) y el tiempo de infección son factores que pueden afectar a la intensidad de la señal. De los diversos tiempos de incubación y tiempos de infección adicionales analizados, un tiempo de incubación de 0 horas y un tiempo de infección de 2 horas dieron lugar a los ULR más altos, seguidos de las muestras que tienen un tiempo de incubación de 1 hora y un tiempo de infección de 0,5 horas, y luego de las muestras que tienen un tiempo de incubación de 0 horas y un tiempo de infección de 0,5 horas. Los resultados también muestran que la incubación de 0 horas y la infección de 2 horas tienen la señal de fondo más baja.

Ejemplo 3. Estudios adicionales para evaluar el efecto del tiempo de infección sobre la sensibilidad del ensayo

[0211] El experimento se configuró como se describe en el Ejemplo 2, excepto que después de sumergir el soporte sólido en la muestra bacteriana de pavo, el soporte sólido se puso en medio y la infección se llevó a cabo inmediatamente, es decir, sin tiempo de incubación para que las bacterias en el soporte sólido crecieran. El tiempo de infección varió de 30 minutos a 2 horas. Las señales se detectaron como se describe anteriormente. Los resultados de tres muestras se muestran en la Figura 6 y los datos se representan gráficamente en las Figuras 7A-

7C. Los resultados muestran que una infección de 2 horas puede aumentar la señal, como se indica en las muestras 24 y 26, no mostró señal en Hygiene a los 30 minutos, pero sí durante la infección de 2 horas.

5 [0212] Las Figuras 8A-8C muestran una comparación entre los diferentes dispositivos GloMax y GloMax 20/20. GloMax y GloMax 20/20 mostraron resultados similares.

Ejemplo 4. Pruebas en muestras de esponjas ambientales de *L. monocytogenes* 19115

10 [0213] *L. monocytogenes* se inoculó sobre superficies de placas de cerámica y se dejaron secar y reposar a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas. Se utilizaron esponjas de muestra para limpiar las baldosas cerámicas y las esponjas se colocaron en una bolsa para su enriquecimiento durante 24 horas a 35 °C. El soporte sólido se utilizó entonces para muestrear las muestras enriquecidas como se describe en el Ejemplo 2. Se utilizaron 100 µl de fagos de *Listeria* (a una concentración de $1,2 \times 10^8$ UFP/ml) para infectar el cultivo bacteriano de pavo durante una hora a 30 °C. Las señales se detectaron utilizando GloMax e Hygiene. Los resultados se muestran en la Figura 9. Los resultados muestran que el dispositivo portátil Hygiene puede detectar muestras ambientales contaminadas con *L. monocytogenes*.

Ejemplo 5. Diferentes dispositivos de detección

20 [0214] Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 2. El tiempo de infección por fagos fue de 1 hora a 37 °C. Las señales se leyeron en GloMax, un luminómetro de mano 3M (“3M”), y Hygiene, los resultados se muestran en la Figura 10. Demuestra que 3M es más sensible a la hora de detectar señales.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo que comprende:
- 5 un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante que tiene un constructo genético insertado en un genoma de bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen indicador; y
- 10 un segundo compartimento que comprende un componente de detección de señales, en donde el componente de detección de señales facilita la detección del producto del gen indicador producido como resultado de la infección de la muestra con el bacteriófago recombinante;
- en donde el dispositivo está exento de medio.
- 15 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el componente de detección de señales es un sustrato y el gen indicador codifica una enzima; y opcionalmente en donde la enzima es una luciferasa.
3. Un método para detectar uno o más microorganismos de interés en una muestra que comprende las etapas de:
- 20 poner en contacto la muestra con un reactivo infeccioso en un dispositivo, en donde el uno o más microorganismos de interés en la muestra, si están presentes, están infectados por el agente infeccioso,
- en donde el dispositivo comprende:
- 25 un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante que tiene un constructo genético insertado en un genoma de bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen indicador;
- 30 poner en contacto el bacteriófago recombinante del primer compartimento con la muestra de modo que el bacteriófago recombinante infecte uno o más microorganismos de la muestra, produciendo de este modo un producto del gen indicador, y
- 35 detectar el producto del gen indicador en un segundo compartimento; en donde el dispositivo está exento de medio.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el segundo compartimento comprende un sustrato, y en donde la detección del producto del gen indicador se realiza después de poner en contacto el producto del gen indicador con un sustrato; o en donde el método comprende además unir los microorganismos de la muestra a un soporte sólido y, opcionalmente, en donde el soporte sólido es una perla, y/o en donde el soporte sólido comprende polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), ácido poliláctico (PLA) y cloruro de polivinilo (PVC).
- 45 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en donde el aparato comprende además un segundo compartimento que contiene un sustrato, y en donde el método comprende además:
- añadir el sustrato del segundo compartimento a la muestra, simultáneamente con, o después de, añadir el bacteriófago recombinante; y/o en donde el primer compartimento comprende un sello, y en donde el bacteriófago recombinante con la muestra se pone en contacto con la muestra rompiendo el sello, en donde la rotura del sello hace que el bacteriófago recombinante del primer compartimento entre en contacto con la muestra e infecte uno o más microorganismos de la muestra, produciendo de este modo un producto del gen indicador.
- 50 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el bacteriófago está liofilizado.
- 55 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el aparato comprende un dispositivo de cierre para mezclar por fases el bacteriófago recombinante y el sustrato con la muestra.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde el soporte sólido está seco antes de entrar en contacto con la muestra.
- 60 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde la incubación es de 0-2 horas; y/o en donde el bacteriófago ha estado en contacto con la muestra durante 0,2-3 horas antes de detectar el producto del gen indicador; y/o la concentración de bacteriófagos para la etapa de incubación es mayor que 1×10^5 UPF/ml, mayor que 1×10^6 UPF/ml, o mayor que 1×10^7 UPF/ml.
- 65

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde el producto del gen indicador comprende al menos uno de entre un fluoróforo, una proteína fluorescente, una partícula y una enzima; y opcionalmente en donde la enzima comprende al menos una de una luciferasa, una fosfatasa, una peroxidasa y una glucosidasa; y opcionalmente en donde la luciferasa es una luciferasa manipulada genéticamente.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde el método detecta tan solo 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o una sola bacteria en una muestra de un tamaño estándar para la industria de la seguridad alimentaria; y/o en donde la muestra comprende carne o verduras; y/o en donde la muestra es una muestra de alimento, agua, productos lácteos, ambiental, comercial o clínica.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en donde la muestra se incuba primero en condiciones que favorecen el crecimiento durante un período de enriquecimiento de 9 horas o menos, 8 horas o menos, 7 horas o menos, 6 horas o menos, 5 horas o menos, 4 horas o menos, 3 horas o menos, o 2 horas o menos.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en donde la detección positiva del resto indicador requiere que la relación entre la señal y el fondo generado al detectar el resto indicador sea de al menos 2,0 o al menos 2,5.
14. Un sistema para detectar microorganismos de interés en una muestra que comprende:
un aparato que comprende:
un primer compartimento que comprende un bacteriófago recombinante que tiene un constructo genético insertado en un genoma de bacteriófago, en donde el constructo comprende un gen promotor y un gen indicador; y
un componente de detección de señales, en donde el componente de detección de señales puede detectar el producto del gen indicador producido al infectar la muestra con el bacteriófago recombinante; y opcionalmente en donde el componente de detección de señales es un luminómetro portátil; en donde el dispositivo está exento de medio.

Tabla 1

Tubos de toma única 10 ul de sustrato de dilución 1:4 durante 4 horas de infección													
N.º de muestra	Recuento de células esperado	Señal Hygienea de mano (1,2 ml)			Señal GloMax 20/20 (1 ml)			Señal GloMax (150 ul de 1,2 ml)			Señal GloMax x 8 (equivalente a 1,2 ml)		
		Carrera 1	Carrera 2	Promedio	Carrera 1	Carrera 2	Promedio	S/F	Carrera 1	Carrera 2		Promedio	S/F
control neg	0	2	1	1,5	75111*	6881	6881	1,0	608	582	595	1,0	4760
1	10	3	2	2,5	7567	7786	7676,5	1,1	654	657	656	1,1	5244
2	100	2	2	2	7887	8015	7951	1,2	610	668	639	1,1	5112
3	1.000	4	3	3,5	11281	10875	11078	1,6	924	960	942	1,6	7536
4	2.000	4	4	4	13885	13715	13800	2,0	1370	1365	1368	2,3	10940
5	4.000	5	5	5	19316	19107	19211,5	2,8	1741	1704	1723	2,9	13780
6	6.000	6	5	5,5	27277	27220	27248,5	4,0	2697	2715	2706	4,5	21648
7	8.000	6	6	6	30574	30183	30378,5	4,4	2846	2729	2788	4,7	22300
8	10.000	7	9	8	46911	46799	46855	6,8	4819	4850	4835	8,1	38676
9	25.000	12	12	12	85397	84315	84856	12,3	7675	7644	7660	12,9	61276
10	50.000	20	20	20	179065	178759	178912	26,0	19181	18876	19029	32,0	152228
11	100.000	38	39	38,5	387890	385559	386724,5	56,2	39577	38611	39094	65,7	312752
12	1.000.000	371	367	369	4535417	4504688	4520052,5	656,9	455802	448071	451937	759,6	3615492

Incubación por la noche, infección de 2 horas

N.º de muestra	Punta antes de la incubación por la noche	Señal Hygienea de mano (1,2 ml)			Señal GloMax 20/20 (1 ml)			Señal GloMax (150 ul de 1,2 ml)			Señal GloMax x 8 (equivalente a 1,2 ml)		
		Carrera 1	Carrera 2	Promedio	Carrera 1	Carrera 2	Promedio	S/F	Carrera 1	Carrera 2		Promedio	S/F
control neg	0	1	1	1	8103	8172	8137,5	1,0	630	639	635	1,0	5076
1	10	9499	9453	9476	126478796	126335449	126407123	155339,0	120782912	120271104	120527008	189955,9	964216064
2	10	8922	8875	8898,5	607686016	594884992	601285504	73890,7	60891648	60485704	60688676	95648,0	485509408

Tabla 2

Figura 2

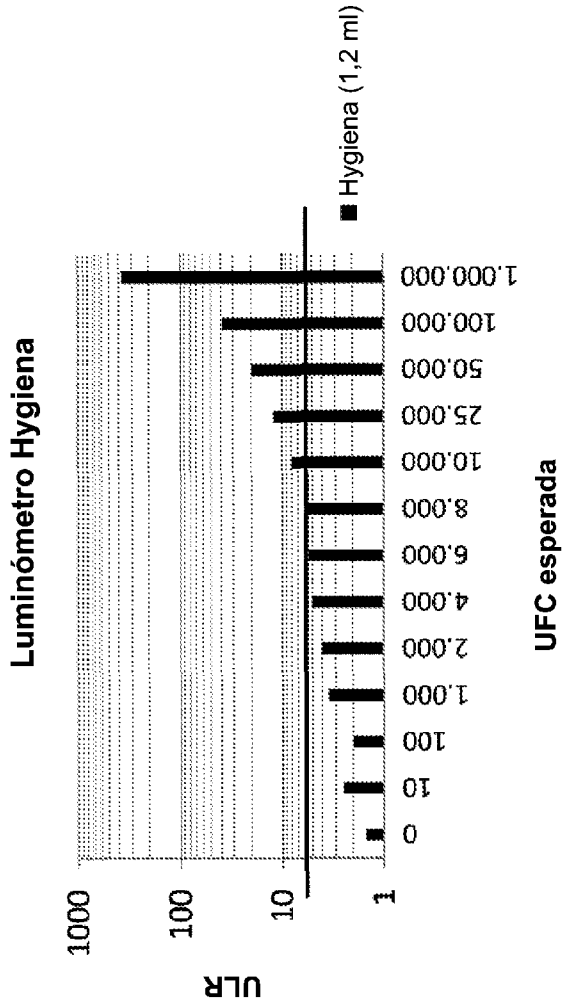


Figura 3A

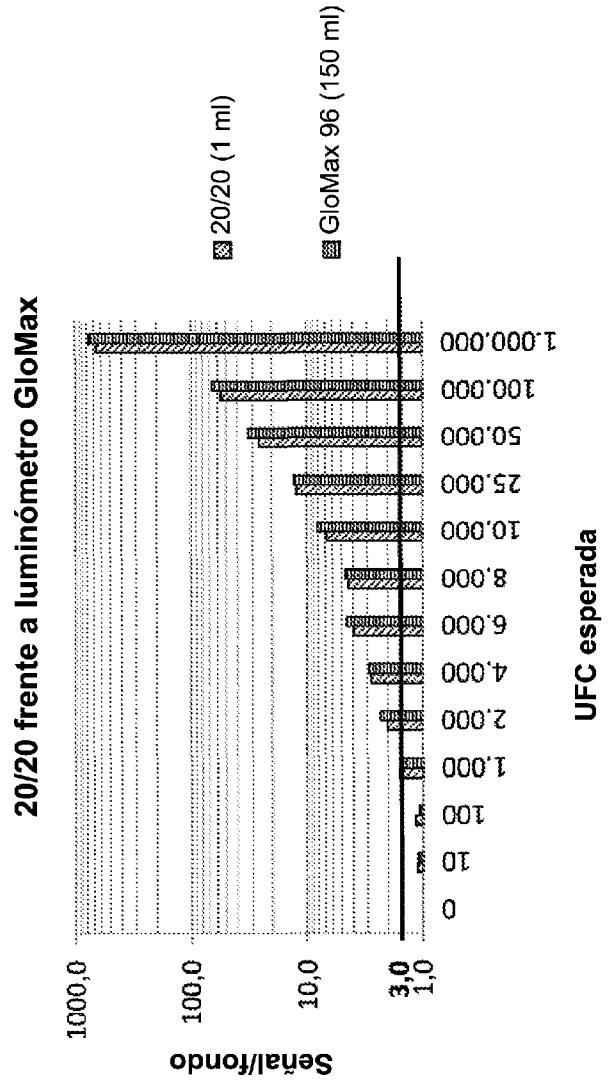


Figura 3B

Muestra no inoculada (n.º 24)

Muestras de pavo enriquecidas durante la noche	Higiene			20/20			placa 96			
	Carrera n.º 1	Carrera n.º 2	Promedio	Carrera n.º 1	Carrera n.º 2	Prom.	Carrera n.º 1	Carrera n.º 2	Promedio	S/F**
Sin enriquecimiento, infección de ½ hora Hisopo 1	0	0	0,25	885	904	951,5	80	62	84,25	0,8
Sin enriquecimiento, infección de ½ hora Hisopo 2	1	0		975	1042		101	94		
Sin enriquecimiento, infección de 2 horas Hisopo 1	0	0	0	335	312	351	56	35	65,25	0,7
Sin enriquecimiento, infección de 2 horas Hisopo 2	0	0		419	338		90	80		
1 hora de enriquecimiento, infección de ½ hora Hisopo 1	0	0	0	937	910	939,5	79	91	86,75	0,9
1 hora de enriquecimiento, infección de ½ hora Hisopo 2	0	0		928	983		86	91		

Tabla 3

Muestra inoculada (n.º 26)

Muestras de pavo enriquecidas durante la noche	Higiene			20/20			placa 96			
	Carrera n.º 1	Carrera n.º 2	Promedio	Carrera n.º 1	Carrera n.º 2	Promedio	Carrera n.º 1	Carrera n.º 2	Promedio	S/F**
Sin enriquecimiento, infección de ½ hora Hisopo 1	249	252	231,3	5612047	5617007	5185788	488697	495305	452987	4529,9
Sin enriquecimiento, infección de ½ hora Hisopo 2	209	215		4758881	4755216		410597	417349		
Sin enriquecimiento, infección de 2 horas Hisopo 1	1485	1324	1174,25	6857016	3641489	8816031	1556311	1591938	1514742	15147,4
Sin enriquecimiento, infección de 2 horas Hisopo 2	1009	879		12270780	12494840		1591938	1318782		
1 hora de enriquecimiento, infección de ½ hora Hisopo 1	180	172	154,75	3043784	3022935	2788381	243195	250985	268535,	2685,4
1 hora de enriquecimiento, infección de ½ hora Hisopo 2	138	129		3022935	2063869		287315	292646	3	

Tabla 4

*Se utilizaron 1000 ULR como valor de fondo

**Se utilizaron 100 ULR como valor de fondo

Figura 4

Infección y tiempo de incubación

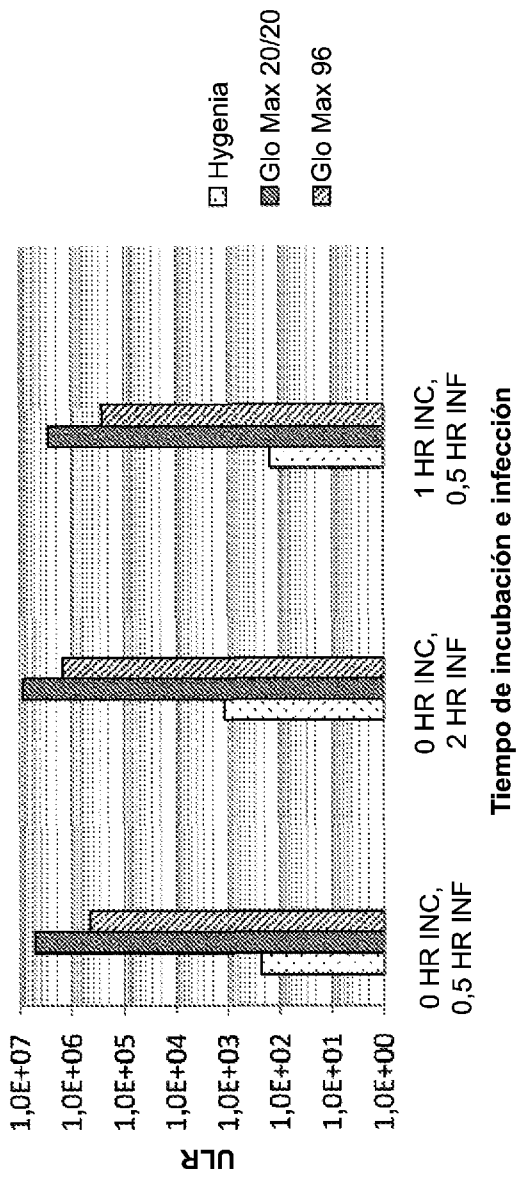


Figura 5A

GloMax 20/20 frente a GloMax 96

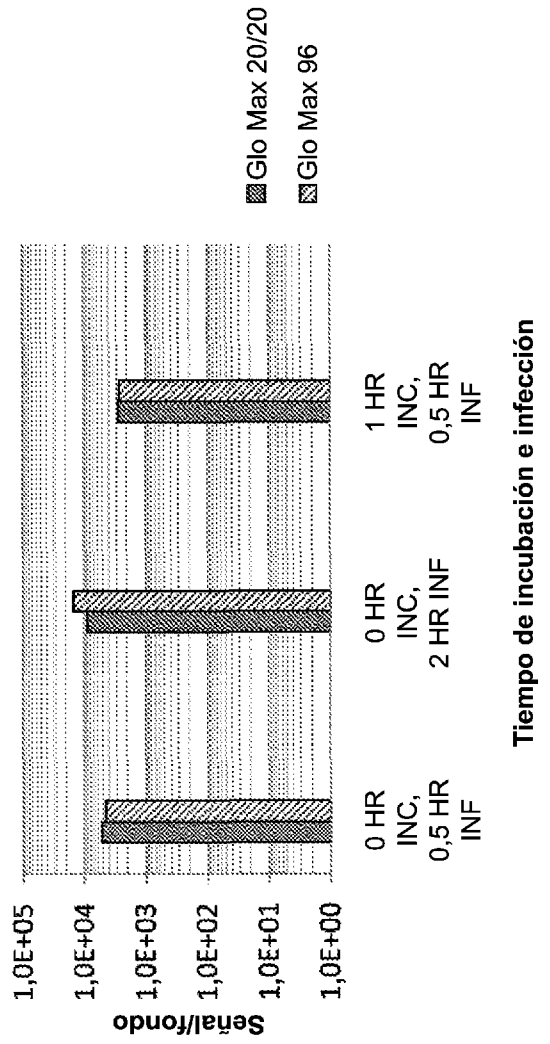


Figura 5B

Tabla 5

Tiempo de infección	Higiencia ULR (1,2 ml)			GloMax 20/20 ULR (1 ml)			GloMax ULR de 96 pocillos (150 ul de 1,2 ml)			S/F**	
	Carrera 1	Carrera 2	Prom.	Carrera 1	Carrera 2	Prom.	S/F*	Carrera 1	Carrera 2		Prom.
30 min	164	175	151,5	5948962	6013964	5580377	5580,377	547613	577622	499504,75	4995,048
30 min	131	136		5136969	5221614			423329	449455		
2 horas	7946	7867	7804,75	1,92E+08	1,9E+08	1,88E+08	187618,9	9095050	9428027	8678287,2	86782,87
2 horas	7599	7807		1,89E+08	1,79E+08			8045154	8144918	5	
30 min	0	0	0	2030	1950	1959,5	1,9595	179	188	181	1,81
30 min	0	0		1930	1928			181	176		
2 horas	213	304	243,75	2864579	2798654	2714867	2714,867	302943	263155	242337	2423,37
2 horas	223	235		2548723	2647512			209433	193817		
30 min	1	1	1	8229	8314	7717,5	7,7175	777	779	755	7,55
30 min	1	1		7149	7178			741	723		
2 horas	6432	6301	6017,75	1,28E+08	1,27E+08	1,25E+08	125323,5	13247709	1278110	14413062	144130,6
2 horas	5556	5782		1,22E+08	1,23E+08			15946914	1567652	3	

*Se utilizaron 1000 para el fondo
 **Se utilizaron 100 para el fondo

Figura 6

Muestra 21

Muestra 24

Muestra 26

Muestra 21: ULR y tiempo de infección

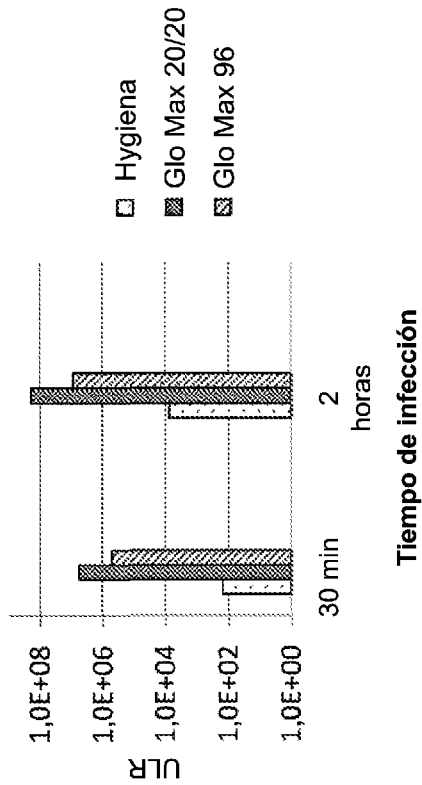


Figura 7A

Muestra 24: ULR y tiempo de infección

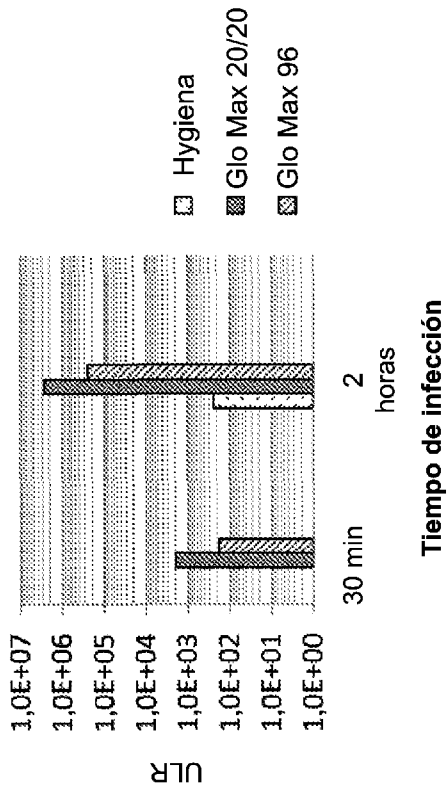


Figura 7B

Muestra 24: ULR y tiempo de infección

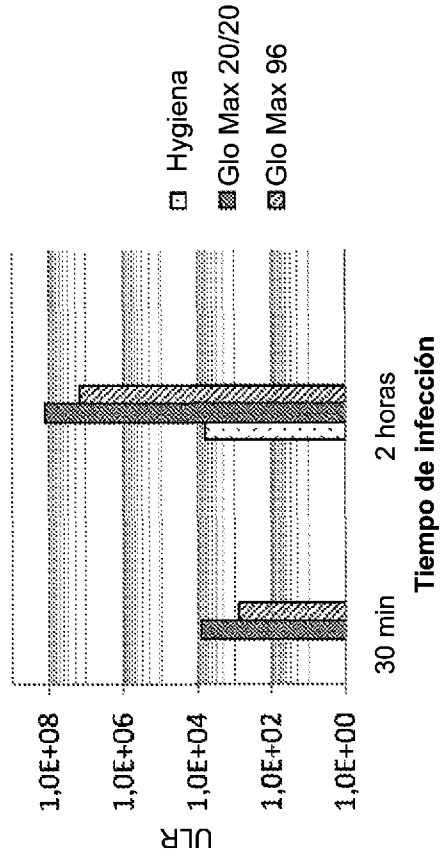
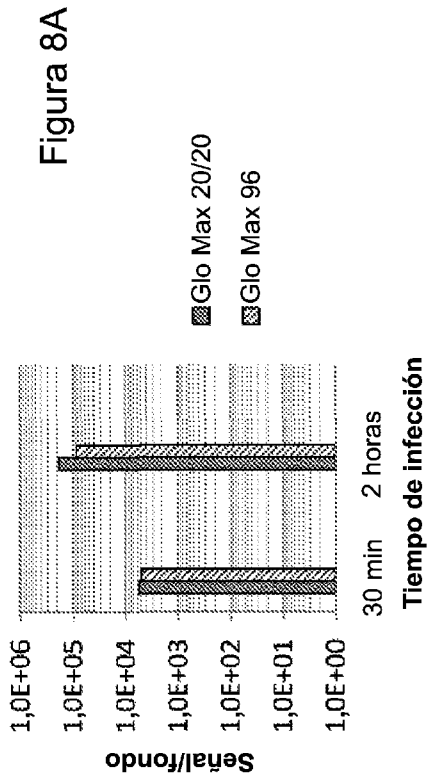
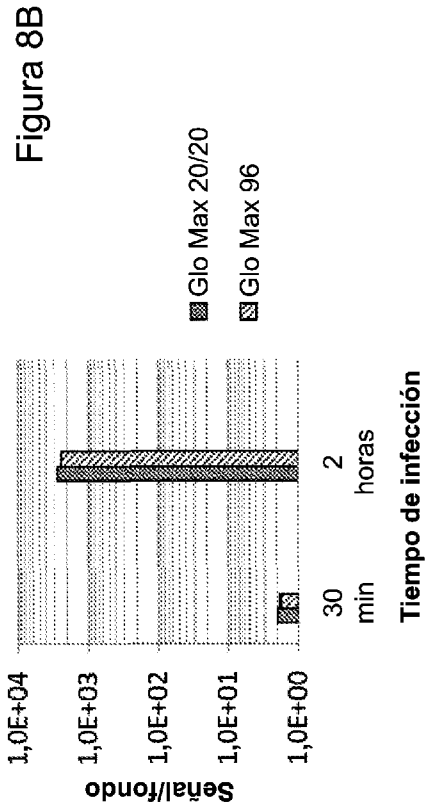


Figura 7C

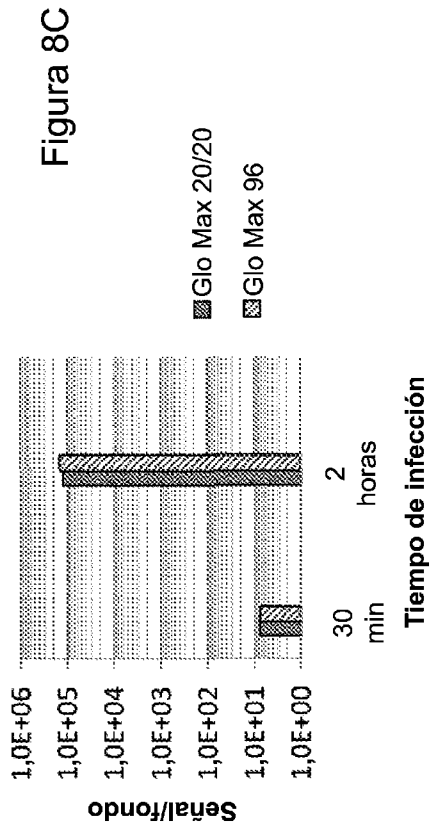
Muestra 21: GloMax 20/20 frente a GloMax 96



Muestra 24: GloMax 20/20 frente a GloMax 96



Muestra 26: GloMax 20/20 frente a GloMax 96



Muestra	Ensayo estándar - enriquecimiento en 24 horas, infección en 4 horas (ULR)	GloMax (150 ml de 1,2 ml), infección de 1 hora (ULR)	Hygiena Manual (1,2 ml), infección de 1 hora	Confirmación de plaqueo*
1	435	640	0	NEG
2	15468765	666426	448	POS
3	562	706	0	NEG
4	43713742	1012737	783	POS
5	562	639	0	NEG
6	48897190	1864908	1437	POS
7	11017	1180	2	POS
8	223748	20247	15	POS
9	512	546	0	NEG
10	8220	1123	1	POS
11	4352	848	1	POS
12	33559	9088	7	POS
13	261	790	1	NEG
14	75047856	1832702	5441	POS
15	44634900	5004141	4331	POS
16	274	390	2	NEG
17	55526364	5673934	969	POS
18	93090176	1353344	6232	POS
19	86	597	2	NEG
20	492244	90464	69	POS
21	2698656	243893	168	POS
22	3295781	27796	195	POS
23	2153051	205597	131	POS
24	18818810	1407324	975	POS
25	539674	471373	203	POS
26	320	652	2	NEG
27	427035	1421085	956	POS
28	554491	209932	153	POS
29	342295	208947	157	POS
30	4628573	9585527	6898	POS
31	3941028	928674	786	POS
32	778	753	2	NEG
33	1408160	301045	224	POS
34	607	665	2	NEG
35	687	1340	2	NEG
36	30358274	6282346	5403	POS

Figura 9

Muestra	GloMax (150 ul de 1,2 ml)	Portátil 3M (1,2 ml)	Portátil Hygiena (1,2 ml)
1	150639	125399	278
2	1601	146	0
3	260334	138231	707
4	522791	290340	1644
5	1402865	514051	1934
6	1814	157	2
7	409691	201626	944
8	1460	146	2
9	630939	231426	1609
10	634884	300458	868
11	561560	393552	1380
12	847341	490712	2394
13	355235	170542	439
14	1668897	591395	3601
15	1052748	512452	1659
16	141908	121216	339
17	1047	67	3
18	448721	250046	1574
19	678726	336346	1831
20	1056815	540753	1687
21	889054	551769	3436
22	620523	469794	1396
23	640261	335898	1315
24	1585	750	5
25	869	109	4
26	1266555	590370	6189
27	560521	455861	1860
28	486627	346393	1908
29	1684520	423541	5122
30	1086815	595188	2516

Figura 10

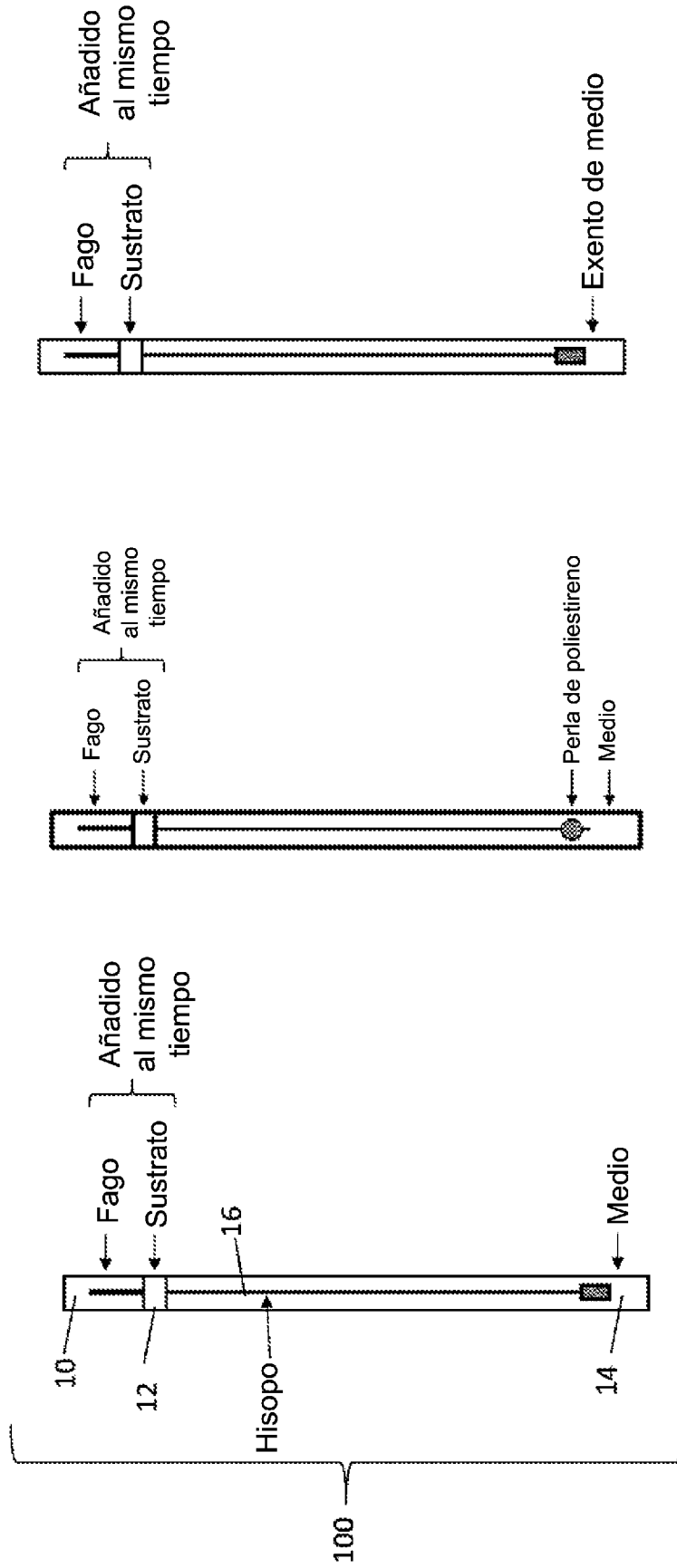


Figura 11C

Figura 11B

Figura 11A

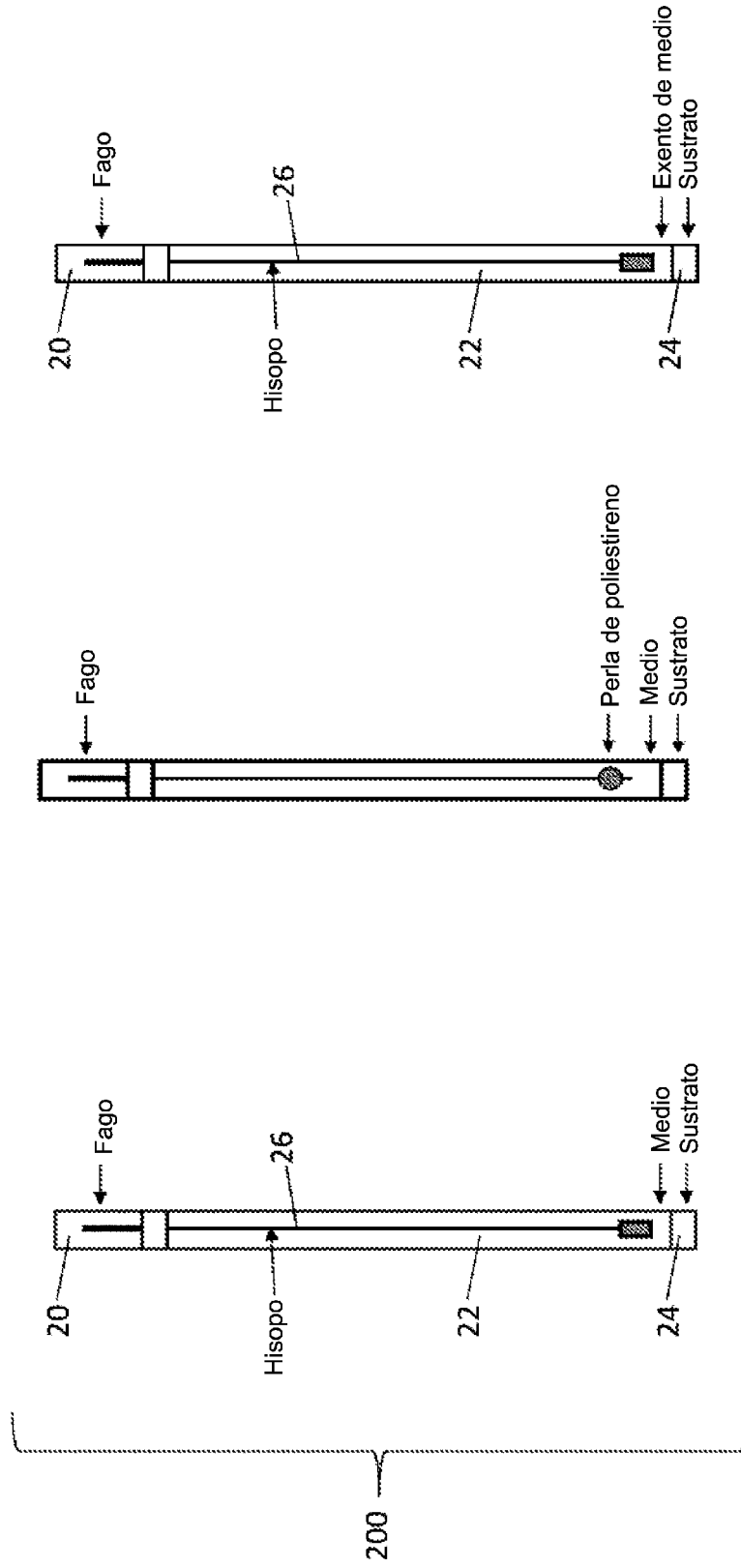


Figura 12C

Figura 12B

Figura 12A

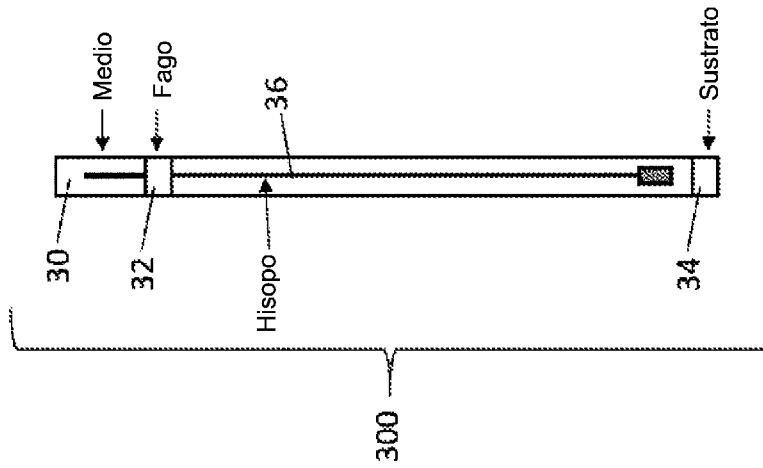


Figura 13A



Figura 13B

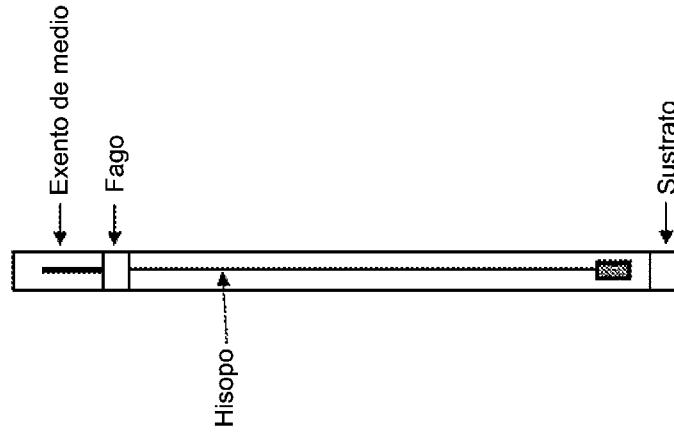


Figura 13C

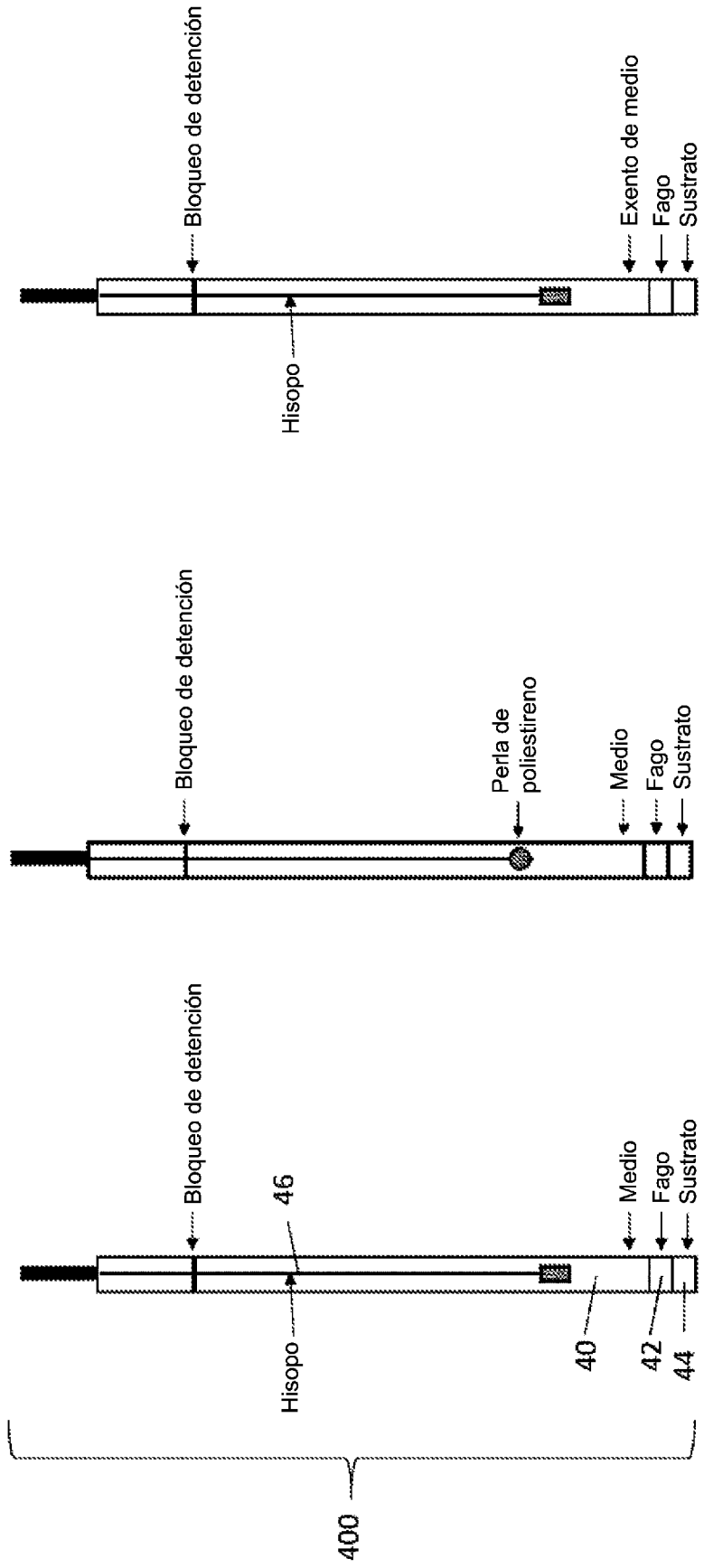


Figura 14C

Figura 14B

Figura 14A

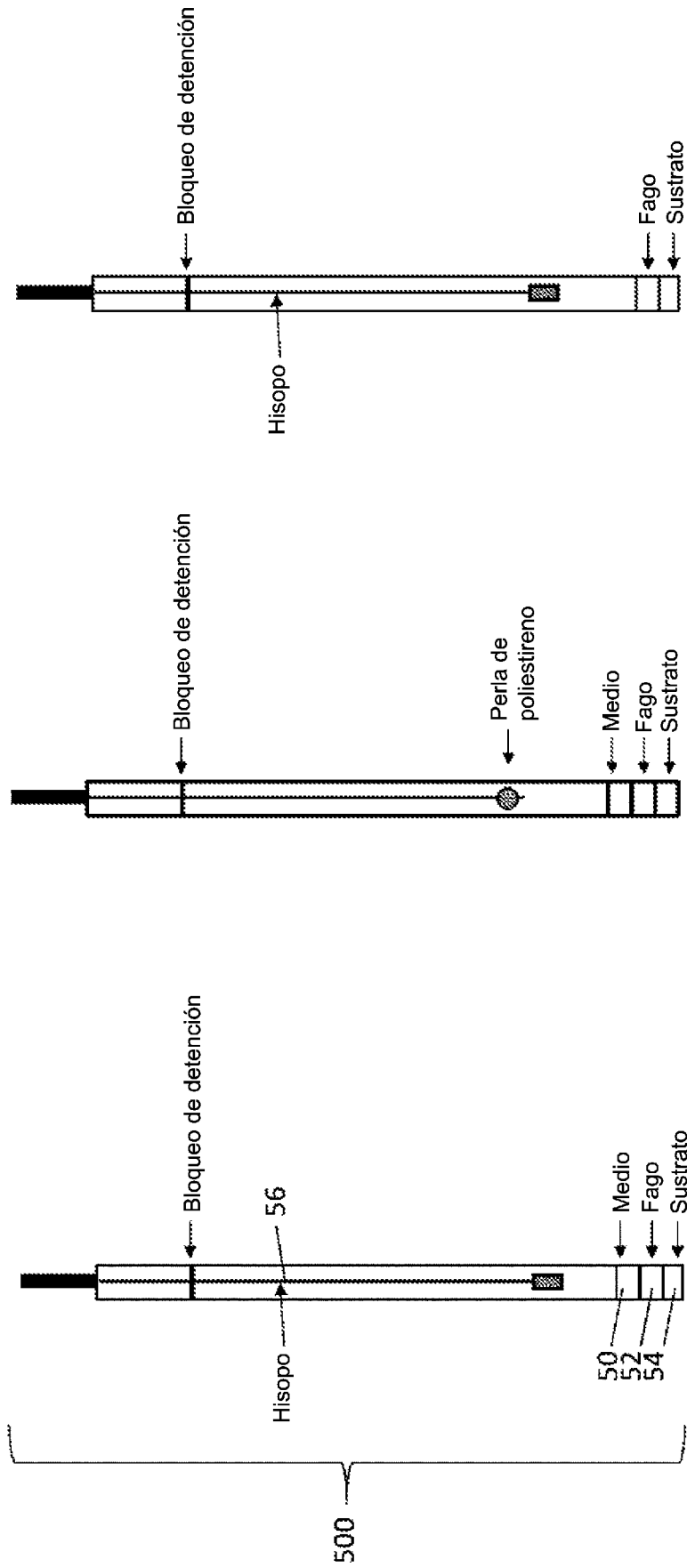


Figura 15A

Figura 15B

Figura 15C

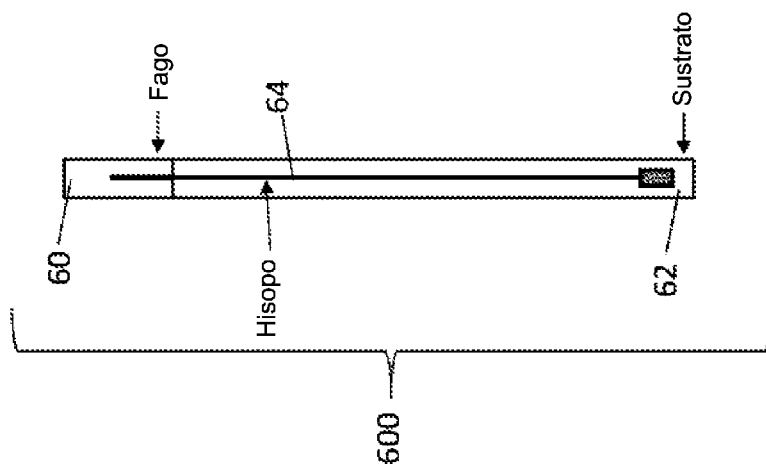


Figura 16

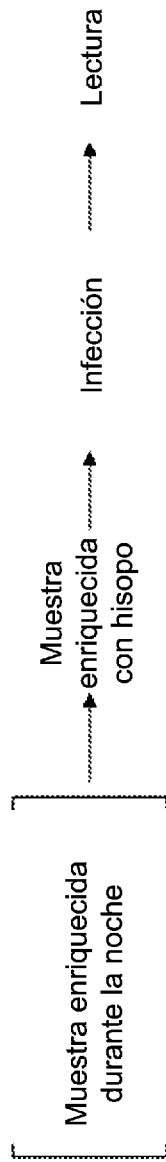


Figura 17