

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 873**

21 Número de solicitud: 202030356

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.04.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.06.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(34.0%)**

**Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación,
Innovación y Transferencia - i2T, Camí de Vera,
s/n - Edificio 8G - Acceso A/B - Planta 3
46022 Valencia ES;**

**CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED, M.P. (33.0%) y
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE (33.0%)**

72 Inventor/es:

**PLA BLASCO, Luis;
SANTIAGO FELIPE, Sara;
AZNAR GIMENO, Elena;
MARTÍNEZ MAÑEZ, Ramón;
FRASQUET ARTES, Juan Salvador;
VALENTIN MARTIN, Amparo;
PEMÁN GARCÍA, Javier y
TORMO MAS, María Ángeles**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

57 Resumen:

Método para la detección y diagnóstico rápido de *Staphylococcus aureus*.

La presente invención se relaciona con un biosensor que comprende un soporte poroso con un indicador en el interior de los poros, y un aptámero anclado a la superficie del soporte poroso en una posición tal que en ausencia/presencia de *S. aureus*, inhibe/permite la salida del indicador al exterior. Asimismo, la invención también se relaciona con el uso de dicho biosensor para la detección y/o la cuantificación de *S. aureus*, y para el diagnóstico de enfermedades causadas por *S. aureus*.

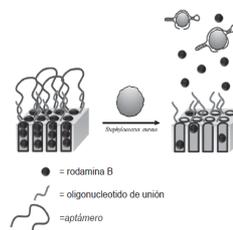


Fig. 1

ES 2 767 873 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección y diagnóstico rápido de *Staphylococcus aureus*

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la detección de bacterias patógenas, en concreto de *S. aureus*, y del diagnóstico de infecciones causadas por *S. aureus* mediante el empleo de materiales capaces de reconocer específicamente esta especie patógena.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Staphylococcus aureus ha sido a lo largo de la historia uno de los patógenos humanos de mayor trascendencia clínica. En la actualidad, según los datos del National Nosocomial Infection Surveillance System (NNISS) del Center for Disease Control (CDC), *S. aureus* constituye el principal microorganismo responsable de infecciones nosocomiales en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), como bacteriemia
15 primaria, neumonía asociada a ventilación mecánica o infección de herida quirúrgica (National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS), Am J Infect Control. 32 (2004): 470-85). En la comunidad, *S. aureus* ocasiona un número importante de infecciones de gravedad variable, con mayor frecuencia de piel y partes blandas, pero también es
20 responsable de infecciones de mayor gravedad y con gran impacto socioeconómico, como las infecciones osteoarticulares y endocarditis, entre otras (Tong S.Y.C. et al. Clin Microbiol Rev doi:10.1128/CMR.00134-14).

Diversos estudios poblacionales realizados en EE.UU. han puesto de manifiesto el
25 impacto de las infecciones por *S. aureus* observadas en sus hospitales, con una incidencia anual de 28,4 infecciones por cada 100.000 habitantes, el 50% de ellas de adquisición nosocomial. En el ámbito hospitalario, el incremento observado en el número de infecciones producidas por este microorganismo ha discurrido paralelo a dos factores: por un lado, el incremento del uso de dispositivos invasivos utilizados en
30 la asistencia médica de los pacientes, especialmente catéteres vasculares, y por otro, la emergencia y posterior diseminación en los hospitales de cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina (SARM).

De manera rutinaria, para la identificación de *S. aureus* en los laboratorios clínicos
35 existen diferentes técnicas de referencia. Por ejemplo, para el diagnóstico de infección

diseminada, sepsis, por *S. aureus* se emplea el hemocultivo. Esta metodología detecta el crecimiento de microorganismos en el interior de las botellas de hemocultivo a partir de la producción de CO₂ mediante lecturas automatizadas del mismo. Una vez detectado crecimiento, se realiza una tinción de Gram para observar morfología y coloración de la bacteria. Si se observan cocos grampositivos (coloración morada) dispuestos en racimos, la identificación de *S. aureus* se realiza mediante pruebas bioquímicas (manitol, DNAsa), aglutinación de partículas de látex o técnicas más sofisticadas como la espectrometría de masas (MALDI-TOF). En otro tipo de muestras clínicas (respiratorias, exudados, líquidos orgánicos, etc.) la identificación de *S. aureus* se efectúa a partir de colonias crecidas en medio de cultivo sólido. Los resultados de todas estas técnicas se obtienen habitualmente a las 24-48 horas, lo que supone un lapso de tiempo que puede resultar vital en algunos casos.

Uno de los principales inconvenientes que conlleva la detección de *S. aureus* es la correcta identificación y diferenciación mediante las técnicas bioquímicas actuales, que además requieren de mucho tiempo, personal y equipamiento especializado. Es muy probable que durante los últimos años hayan existido multitud de casos en los que se haya infradiagnosticado o no identificado correctamente las infecciones por *S. aureus*, dificultando e incluso imposibilitando la recuperación del paciente. Desarrollar un nuevo método diagnóstico eficaz, rápido y fiable es por tanto primordial.

Métodos desarrollados para mejorar la identificación de *S. aureus* se describen, por ejemplo, en los documentos US8632968B2 y WO201916775. La patente US8632968B2 divulga un método para detectar microorganismos, incluyendo *S. aureus*, basado en la detección de oligonucleótidos específicos para *S. aureus*. Este método requiere el aislamiento de ácidos nucleicos de microorganismos presentes en una muestra, la amplificación de dichos ácidos nucleicos usando cebadores específicos para *S. aureus*, y hibridación de una sonda oligonucleotídica específica para los ácidos nucleicos de *S. aureus* amplificados. La solicitud internacional WO2019216775 divulga un dispositivo para detectar anticuerpos de bacterias patógenas, como *S. aureus*, en fluidos corporales. El dispositivo es una tira que comprende un material que permite el flujo capilar de fluido a lo largo de una porción de la tira. La presencia de anticuerpos específicos de *S. aureus* en el fluido hace que se produzca un cambio de color en una parte de la tira que contiene el patógeno o el antígeno inmovilizado. Pese a las ventajas aportadas por este tipo de métodos, aún

presentan inconvenientes como la necesidad de personal y equipamiento especializado para realizar la extracción y amplificación de los ácidos nucleicos, o la pobre sensibilidad de los métodos basados en tiras donde bajas concentraciones de anticuerpos de *S. aureus* en los fluidos corporales, puede resultar en falsos negativos o en resultados difíciles de interpretar. Además, la presencia de anticuerpos no implica la presencia de una infección activa.

Así, a la vista del estado de la técnica, es necesario el desarrollo de métodos alternativos a los ya descritos para la detección y/o diagnóstico de *S. aureus* que no presenten las desventajas e inconvenientes de los dispositivos/métodos anteriores, especialmente la necesidad de personal y equipamiento especializado y la falta de robustez en el resultado obtenido.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un biosensor para la detección y/o diagnóstico de *Staphylococcus aureus* que solventa los problemas de los dispositivos y métodos del estado de la técnica, es decir, permite la detección de *S. aureus* de manera rápida, sencilla y con un alto nivel de sensibilidad y selectividad. El biosensor desarrollado por los autores de la presente invención está basado en un material poroso que comprende un indicador y unos aptámeros que reconocen de forma específica *S. aureus*, de forma que cuando *S. aureus* está presente en el medio, los aptámeros reconocen dicha bacteria, se unen a ella, y se produce la liberación del indicador la cual se puede detectar (ver Figura 1). Así, la detección de dicho indicador es indicativo de presencia de *S. aureus* en el medio.

En base a este biosensor, los inventores también han desarrollado un método de detección de *S. aureus* y un método de diagnóstico de enfermedades causadas por dicha bacteria patógena.

Biosensor de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un biosensor, de aquí en adelante “el biosensor de la invención”, que comprende

- un soporte poroso que comprende un indicador en el interior de los poros, y

- un aptámero que reconoce de forma específica *Staphylococcus aureus*,
en donde
- una pluralidad de poros comprenden un acceso al exterior del soporte poroso, y
- el aptámero está anclado a la superficie del soporte poroso en una posición tal
5 que
 - (i) en ausencia de *S. aureus*, el aptámero impide la salida del indicador del soporte poroso, y
 - (ii) en presencia de *S. aureus*, el aptámero reconoce y se une a dicha
10 bacteria, permitiendo la salida del indicador del soporte poroso.

10

El biosensor de la invención presenta ventajas que son ideales para los métodos y usos descritos en la invención. Una de las principales ventajas es que el aptámero reconoce las células de *S. aureus*, lo que junto con la gran capacidad de amplificación de la señal debido a la presencia de rodamina B en los poros, permite un nivel de
15 detección de hasta 2 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Esta combinación de características permite al biosensor de la invención tener una gran sensibilidad y fiabilidad para detectar *S. aureus*. Además, el biosensor de la invención, los métodos y usos de la invención no requieren personal especializado, así como no requieren equipamiento especializado, permitiendo, en el caso más simple, la
20 detección por observación visual directa del medio. Además, los métodos de detección y/o cuantificación y de diagnóstico de la invención pueden ser realizados en 1 hora, reduciendo el tiempo necesario para determinar la presencia de *S. aureus* en una muestra, comparando con los tests usados rutinariamente.

25

En la presente invención el término “biosensor” se refiere a un dispositivo que se utiliza para detectar y/o diagnosticar *S. aureus* basándose en la interacción molecular específica entre *S. aureus* y el aptámero que reviste el sensor. La interacción da lugar a un complejo intermedio que induce la generación de la señal. Un biosensor puede ser un dispositivo analítico que convierte una respuesta biológica en una señal
30 eléctrica, una señal óptica u otro esquema de transducción.

El biosensor de la invención comprende: un soporte poroso y un aptámero anclado a la superficie del soporte poroso.

35

En la presente invención el término “soporte poroso” se refiere a aquel sustrato que

comprende poros y que tiene una superficie a la cual se pueden unir moléculas de forma indirecta a través de un elemento de unión. El soporte poroso empleado en la presente invención puede incluir cualquier material de sustrato que comprenda poros a lo largo de su superficie con un acceso al exterior del soporte poroso, y que

5 proporcione soporte físico para la captura de elementos o sondas que están unidos a dicha superficie. Los poros son clasificados por la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) por el tamaño del poro, midiendo dicho tamaño por el diámetro interno del mismo asumiendo que éste es cilíndrico, o por la distancia entre las paredes internas y opuestas de un poro con una configuración diferente. Así,

10 siguiendo el criterio de la IUPAC, si el diámetro de un poro (o la distancia entre las paredes internas u opuestas de un poro) es de aproximadamente 2 nm o menor de 2 nm, entonces el poro es denominado microporo, si es mayor de 2 nm, pero menor de 50 nm se denomina mesoporo (o nanoporo), y si es de aproximadamente 50 nm o mayor de 50 nm, entonces es un macroporo. Teniendo en cuenta esta clasificación, se

15 considera que un material es microporoso cuando el tamaño promedio de los poros de dicho material es de aproximadamente 2 nm o menor de 2 nm, que es mesoporoso (o nanoporoso) cuando el tamaño promedio de los poros de dicho material es mayor de 2 nm, pero menor de 50 nm, y que es macroporoso cuando el tamaño promedio de los poros de dicho material es de aproximadamente 50 nm o mayor de 50 nm. En la

20 presente invención, el tamaño promedio de los poros del soporte poroso es entre 2 y 100 nm. Así, en otra realización preferida del biosensor de la invención, el soporte poroso es microporoso, mesoporoso o macroporoso. Más preferiblemente, el soporte poroso comprende poros con un tamaño medio de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 nm más preferiblemente con tamaños comprendidos entre 2 y

25 50 nm, aún más preferiblemente con un tamaño de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nm. En los ejemplos de la presente invención el tamaño de poro medio empleado es de 5 nm. Métodos para determinar el tamaño del poro son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Ejemplos de estos métodos incluyen, sin limitar a, experimentos de adsorción-desorción, porosimetría de mercurio, SAS (*small-angle scattering*), NMR

30 (*nuclear magnetic resonance*) y STM-AFM (*scanning tunneling and atomic force microscopies*) entre otros.

Además del tamaño de poro, otro parámetro que caracteriza al soporte poroso es la porosidad del mismo. La porosidad se define como la medida de espacios vacíos en

35 un material, y es una fracción del volumen de huecos sobre el volumen total del

material que va desde el 0 al 1 o, si se expresa en porcentaje, desde 0 a 100%. La porosidad de un sistema puede ser medida por diversos métodos. El más simple es el método directo, en el cual el volumen total del sistema es medido y posteriormente la muestra es compactada para remover todo el espacio poroso. Luego la diferencia de estos volúmenes nos da la porosidad total del sistema. Para medir la porosidad accesible el método más ampliamente utilizado es el llamado expansión de gas, pero existen otros como la microscopía óptica de polarización, o la microscopía electrónica de barrido. Respecto a los métodos indirectos de la medida de la porosidad, éstas técnicas consisten en la introducción de fluidos (líquidos como el agua o el mercurio, o gases como el nitrógeno o el helio) en los espacios vacíos del material, y determinar el volumen de fluido introducido, lo que indica el volumen de vacíos existente. En la presente invención, el soporte poroso puede comprender cualquier porosidad. No obstante, preferiblemente comprende una porosidad de entre 10^9 y 10^{12} cm^{-2} , más preferiblemente, entre 10^{11} y 10^{12} cm^{-2} .

Otra característica del soporte poroso del biosensor de la invención es que comprende una pluralidad de poros que comprenden un acceso al exterior del soporte poroso. En el estado de la técnica este tipo de poros se denominan poros abiertos. Como se ha explicado al principio de la presente descripción, dicho acceso al exterior del soporte poroso es el que está bloqueado por el aptámero en ausencia de *S. aureus* y que impide la salida al exterior del indicador que está almacenado dentro de los poros.

El soporte poroso del biosensor de la invención puede ser de cualquier material que sea poroso según se ha definido en los párrafos anteriores. Ejemplos de materiales porosos que pueden usarse en el contexto de la presente invención como soporte poroso incluyen, sin limitar a, alúmina anódica nanoporosa, sílica nanoporosa, óxido de titanio y grafeno. No obstante, en una realización preferida del biosensor de la invención, el soporte poroso es dióxido de silicio o alúmina.

El soporte poroso del biosensor de la invención comprende un indicador en el interior de los poros. En la presente invención el término "indicador" se refiere a cualquier compuesto susceptible de ser visualizado y/o cuantificado. Ejemplos de indicadores incluyen, sin limitarse a, colorantes, fluoróforos, sustancias con actividad redox, con resonancia plasmónica o biológicamente activas como agentes citotóxicos, proteínas, pequeñas biomoléculas, enzimas o fragmentos de ácidos nucleicos. En una

realización preferida del biosensor de la invención, el indicador es rodamina B.

Otro de los componentes del biosensor de la invención es un aptámero que reconoce de forma específica *S. aureus*. Así, en la presente invención el término “aptámero” se refiere a una molécula monocatenaria de ADN o ARN que puede plegarse en una variedad de estructuras. Un aptámero se puede unir específicamente a su diana con una afinidad en el rango de nano-picomolar. El aptámero de la presente invención tiene dos funciones: por un lado, reconocer específicamente *S. aureus*, y por otro lado bloquear los poros del material poroso, impidiendo la salida del indicador. En el biosensor de la invención el aptámero presenta una conformación estructural secundaria que, en las condiciones correctas, reconoce específicamente la pared de la bacteria, lo que produce un desplazamiento de la secuencia nucleotídica (del aptámero) de la superficie del soporte poroso como consecuencia de que la fuerza de afinidad entre la pared de la bacteria y el aptámero es más grande que las fuerzas que unen el aptámero al soporte poroso. Esto resulta en la apertura o desbloqueo de los poros y en la difusión del indicador al medio de ensayo. Así, en una realización preferida del biosensor de la invención, el aptámero comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 (5'-TTT TGG GGG GTC CCT ACG GCG CTA ACC CCC CCA GTC CGT CCT CCC AGC CTC ACA CCG CCA CCG TGC TAC AAC GGG GGG TTT T-3'). Dicha secuencia SEQ ID NO: 2 reconoce específicamente la pared de las células de *S. aureus*, garantizando no solo la especificidad del biosensor para *S. aureus*, sino también que la detección y/o el diagnóstico de las células bacterianas es directa y no a través de biomarcadores de *S. aureus*, los cuales no implican la presencia activa de dicha especie bacteriana.

En el biosensor de la invención, el aptámero está anclado a la superficie del soporte poroso en una localización tal que, en ausencia de *S. aureus*, los poros del material poroso están bloqueados, impidiendo la salida del indicador. Dicho anclaje puede producirse directamente a la superficie del soporte por interacción electrostática o adsorción o mediante un enlazador o *linker* que facilita su unión electrostática o covalente.

No obstante, en una realización preferida del biosensor de la invención, el aptámero está anclado a la superficie del soporte poroso a través de un grupo orgánico polar derivatizado con un oligonucleótido de unión, en donde la secuencia de nucleótidos de

dicho oligonucleótido de unión es parcialmente complementaria al aptámero.

En la presente invención el término "grupo orgánico polar" se refiere a compuestos que contienen carbono y que tienen regiones distintas de carga positiva y negativa como resultado de la unión con átomos como el nitrógeno, el oxígeno o el azufre. El grupo orgánico polar puede estar en forma neutra o catiónica. En la presente invención los términos "grupo orgánico neutro" y "grupo orgánico catiónico" se refieren a compuestos en los cuales la suma de las cargas de las distintas regiones es neutra o positiva, respectivamente.

10

Así, en una realización preferida del biosensor de la invención, el grupo orgánico neutro se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico (-COOH), alcohol (-OH), aldehído (-CHO), alqueno C_2-C_{30} , alquino C_2-C_{30} , amina (-NH₂ ó -NR'R''), amida (-C(O)NR'R''), azida (-N₃), cetona (-C=O), éster (-COOR'), éter (R'-O-R''), halógeno, imina (RR'C=NR''), isocianato (-NCO), isotiocianato (-N=C=S), nitrilo (-C≡N), nitro (-NO₂) y tiol (-SH), representando cada R' y R'', de manera independiente, un hidrógeno, un alquilo C_2-C_{30} , un alqueno C_2-C_{30} , o un alquino C_2-C_{30} , todos estos grupos pueden ser lineales o ramificados o estar sustituidos o no sustituidos. En una realización más preferida, el grupo orgánico neutro es el isocianato (-N=C=S).

20

En otra realización preferida del biosensor de la invención, el grupo orgánico catiónico se selecciona del grupo que consiste en aminas (-NH₄⁺), grupos guanidinio ([CH₆N₃]⁺), fosfonio (-PH₄⁺) o de amonio cuaternario (-NR₄⁺), en donde cada R se selecciona independientemente entre un alquilo C_1-C_{30} , lineal o ramificado, y un cicloalquilo C_3-C_6 .

25

En una realización preferida del biosensor de la invención, el grupo orgánico polar está derivatizado con un oligonucleótido de unión que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (NH₂-(CH₂)₆-5'-AAA AAA CCC CCC-3'). Como se puede apreciar, el oligonucleótido de unión tiene una secuencia de nucleótidos tal que hibrida parcialmente con el aptámero que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2.

30

En la presente invención, el término "derivatizado" se refiere a la conversión de un compuesto original en una sustancia químicamente similar mediante cambios químicos.

35

En la presente invención el término “oligonucleótido” se refiere a moléculas de ADN o ARN monocatenarias de secuencia corta, tanto naturales como artificiales, donde los nucleótidos pueden ser modificados, por ejemplo, mediante metilación en 5’.

5

Tal como se ha indicado en párrafos anteriores, en el biosensor de la invención el aptámero está anclado a la superficie del soporte poroso en una posición tal que

- (i) en ausencia de *S. aureus*, el aptámero bloquea el acceso de los poros al exterior impidiendo la salida del indicador, y
- 10 (ii) en presencia de *S. aureus*, el aptámero reconoce y se une a dicha bacteria, desbloqueando el acceso de los poros al exterior y permitiendo la salida del indicador.

Por lo tanto, el anclaje del aptámero cubre toda la superficie exterior del material poroso, incluyendo el borde de los poros para que pueda funcionar como “puerta molecular” y, dependiendo de la presencia o ausencia de *S. aureus* en el medio, el aptámero sufra un cambio de conformación estructural que o bien permita la salida del indicador (el acceso del poro con el exterior no está bloqueado) o bien impida la salida del mismo (el acceso del poro con el exterior está bloqueado).

20

Usos del biosensor de la invención

A lo largo de los párrafos anteriores, se ha puesto de manifiesto el funcionamiento del biosensor de la invención y su utilidad en la detección de *S. aureus*. Además, los inventores han observado que el biosensor de la invención no solo es útil para detectar *S. aureus* en el medio, sino que la cantidad de indicador liberada al medio es proporcional a la concentración de *S. aureus*, por lo que el biosensor de la invención también es útil en la cuantificación de *S. aureus*.

30 Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del biosensor de la invención para la detección y/o cuantificación de *S. aureus* en una muestra, de ahora adelante el “uso del biosensor de la invención”.

S. aureus puede estar presente en una amplia variedad de ambientes, desde suelos, agua y aire, utensilios y superficies, hasta en humanos y animales. En la industria

35

alimentaria, la presencia de *S. aureus* en las zonas de procesado de los alimentos puede originar la contaminación de estos, con el correspondiente riesgo para la salud humana y animal. Así, la detección y/o cuantificación de *S. aureus* mediante el biosensor de la invención puede llevarse a cabo en cualquier muestra que sea susceptible de estar contaminada por *S. aureus*.

En la presente invención se entiende por “muestra” a una parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella para someterla a estudio, análisis o experimentación. En la presente invención, dicho estudio, análisis o experimentación hace referencia a la presencia/ausencia de *S. aureus*. Ejemplos de muestras adecuadas para el método de detección de la invención incluyen, sin limitarse a, muestras clínicas, muestras alimentarias y muestras ambientales. Dentro del término “muestra” también se incluyen muestras que han sido manipuladas de alguna manera después de su obtención, por ejemplo, mediante el tratamiento con reactivos, la solubilización o el enriquecimiento de ciertos componentes. En una realización preferida, las muestras aisladas son procesadas para obtener una solución líquida con los componentes que componen la muestra, incluido las células de *S. aureus* presentes. En una realización preferida del uso de la invención, la muestra es una muestra alimentaria, una muestra clínica o una muestra ambiental.

En la presente invención se entiende por “muestra alimentaria” a aquella muestra aislada de un alimento, tanto sólido como líquidos, procesados o crudos.

En la presente invención se entiende por “muestra ambiental” aquella muestra que procede del entorno o del medio ambiente y que es susceptible de ser o estar contaminado por *S. aureus*, tal como aguas residuales industriales o caseras, soluciones laborales como soluciones tampón, líquidos de cultivo, soluciones de reacción, lavados y similares.

En la presente invención se entiende por “muestra clínica” a aquella muestra aislada de un sujeto. El término “muestra clínica” abarca tanto muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de ellos y su progenie, como células en cultivo celular, los sobrenadantes celulares, los lisados celulares, el suero,

el plasma, los fluidos biológicos y las muestras de tejidos. Ejemplos de muestras clínicas adecuadas para el uso de la invención incluyen, sin limitarse a, tejidos celulares, material fecal y líquidos corporales, tales como, sangre, orina, saliva, suero y líquido pleural, líquido peritoneal, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo. En una
5 realización preferida en el uso de la invención, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

En la presente invención, la muestra clínica es aislada de un sujeto. El término
10 “sujeto”, tal como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a cualquier animal, preferiblemente un mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates, y humanos. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier sexo, edad o raza.

15 En la presente invención se entiende por “detectar” o “detección” al reportar o identificar células de *S. aureus* en una muestra.

En la presente invención se entiende por “cuantificar” o “cuantificación” a la determinación de cantidad, número, o concentración en unidad de volumen, de las
20 células bacterianas de *S. aureus* en una muestra.

El biosensor de la invención también es de utilidad en el diagnóstico de enfermedades causadas por *S. aureus*. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del biosensor de la invención para diagnosticar *in vitro*, de ahora adelante “el uso
25 diagnóstico del biosensor de la invención”, una enfermedad causada por *S. aureus* en un sujeto.

El término “sujeto” ha sido definido en párrafos anteriores y es aplicable al presente aspecto inventivo. Así, en una realización preferida del uso diagnóstico del biosensor
30 de la invención, el sujeto es ser humano.

En la presente invención se entiende por “diagnosticar” al procedimiento por el cual se identifica una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier condición de salud-enfermedad, mediante el análisis de una serie de parámetros
35 clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras

enfermedades con cuadros clínicos semejantes. En la presente invención la enfermedad a identificar es aquella causada por *S. aureus*, y el parámetro clínico es la presencia de *S. aureus* en una muestra aislada del sujeto.

5 *S. aureus* es una bacteria patógena, Gram-positiva, inmóvil, catalasa positiva, no formadora de esporas, que puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ambientes sin humedad. Su crecimiento se desarrolla entre los 7°C hasta los 50 °C, teniendo su óptimo de crecimiento en los 35 °C. Su capacidad para producir en pocas horas enterotoxinas resistentes al calor, la convierte en una bacteria causante de un
 10 gran número de intoxicaciones alimentarias, así como el causante de diversos procesos infecciosos que van desde infecciones cutáneas hasta enfermedades sistémicas mortales. Ejemplos de enfermedades causadas por *S. aureus* incluyen, sin limitarse a, infecciones de la piel o tejidos blandos, intravasculares, de los huesos, articulares, respiratorias, otras infecciones invasivas como meningitis o del espacio
 15 quirúrgicos, enfermedades mediadas por toxinas u otras infecciones asociadas a materiales externos al cuerpo como catéteres y prótesis, entre otras. No obstante en una realización preferida del uso diagnóstico del biosensor de la invención, la enfermedad causada por *S. aureus* se selecciona del grupo que consiste en síndrome de la piel escaldada por estafilococo, intoxicación alimentaria, Síndrome de *shock*-
 20 tóxico estafilocócico, absceso cutáneo, impétigo, foliculitis, ántrax (forunculosis), celulitis de cara y cuello, hidradenitis supurada, mastitis, bacteremia, sepsis, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis, artritis séptica, meningitis, peritonitis, pericarditis, piominitis y síndrome de coagulación intravascular diseminada.

25 Métodos de la invención

De forma análoga a los usos del biosensor de la invención descritos en párrafos anteriores, en la presente invención también se contemplan los métodos dirigidos tanto a detectar y/o cuantificar *S. aureus* en una muestra, como los dirigidos a diagnósticas
 30 enfermedades causadas por una infección de *S. aureus* en un sujeto.

Por lo tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con un método *in vitro* para detectar y/o cuantificar *S. aureus*, de ahora adelante el “método de detección y/o cuantificación de la invención”, en una muestra que comprende:

- 35 a) poner en contacto el biosensor de la invención con una muestra, y

b) detectar o medir el indicador en el medio,
en donde

- la presencia del indicador en el medio es indicativa de la presencia de *S. aureus* en la muestra, y/o
- 5 - la cantidad del indicador en el medio es proporcional a la concentración de *S. aureus* en dicho medio.

Los términos “detectar”, “cuantificar”, “*S. aureus*” y “muestra”, han sido definidos o explicados en párrafos anteriores, y dichas definiciones y las realizaciones particulares
10 de los mismos son aplicables al presente aspecto inventivo. Así, en una realización particular del método de detección y/o cuantificación de la invención, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra alimentaria, una muestra ambiental o una muestra clínica, preferiblemente, la muestra clínica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

15

La primera etapa del método de detección y/o cuantificación de la invención [etapa a)] comprende poner en contacto el biosensor de la invención con una muestra. Como se ha explicado en párrafos anteriores, dicha muestra ha podido ser tratada previamente antes de ser puesta en contacto con el biosensor. Técnicas de manipulación o
20 preparación de muestras para ser sometidas al análisis de sus componentes, en particular, para el análisis de la detección de microorganismos, son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. En una realización preferida del método de detección y/o cuantificación de la invención, previamente a la etapa a), el método comprende mezclar la muestra con una disolución tampón.

25

El término “disolución tampón” en la presente invención se refiere a soluciones en concentraciones relativamente elevadas de un ácido y su base conjugada, es decir, sales hidrolíticamente activas. Tienen la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases
30 fuertes. En el método de detección y/o cuantificación de la presente invención la disolución tampón permite mantener el pH del medio en un umbral estrecho de modo a evitar cambios en la solución que puedan afectar el resultado del método. En una realización preferida la “disolución tampón” es solución tampón de fosfato (PBS en la sigla en inglés). En una realización preferida, el pH del medio es de 6,5 a 8,5,
35 preferiblemente pH de 7 a 8, aún más preferiblemente pH 7,5.

En una segunda etapa [etapa b)], el método de detección y/o cuantificación de la invención comprende detectar o medir el indicador en el medio. Los medios y técnicas necesarias para detectar o cuantificar el indicador en el medio son determinados por el
5 indicador utilizado, y tales medios y técnicas son conocidos en el estado de la técnica por un experto en la materia que sabrá cuales medios y técnicas utilizar. Ejemplos de métodos o técnicas incluyen, sin limitarse a, observación visual, espectroscopía de fluorescencia o ultravioleta-visible. En una realización preferida del método de detección de la invención, la detección y la cuantificación se realiza por medición de la
10 intensidad de fluorescencia del medio, más preferiblemente, la medición de la intensidad de fluorescencia con una longitud de onda de 550 a 625 nm del medio.

Una vez detectada o medida la cantidad de indicador en el medio, el biosensor permite concluir que

- 15 - la presencia del indicador en el medio es indicativa de la presencia de *S. aureus* en la muestra, y/o
- la cantidad del indicador en el medio es proporcional a la concentración de *S. aureus* en dicho medio.

20 En la presente invención, la expresión “la presencia del indicador en el medio es indicativa de la presencia de *S. aureus* en la muestra” se refiere a que el aptámero del biosensor de la invención se ha conectado, unido, o ha reconocido a las células de *S. aureus*, desbloqueando los poros del soporte poroso y liberando el indicador al medio.

25 En la presente invención, la expresión “la cantidad del indicador en el medio es proporcional a la concentración de *S. aureus* en dicho medio” se refiere a una relación proporcional entre el indicador en el medio y el número de células de *S. aureus* en el medio, es decir, un cambio en la cantidad del indicador en el medio se corresponde con un cambio en la concentración de *S. aureus* en el medio.

30

Debido a las características del biosensor de la invención, éste también puede emplearse en el diagnóstico de enfermedades causadas por *S. aureus*. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad causada por *S. aureus*, de ahora en adelante el “método
35 de diagnóstico de la invención”, en un sujeto que comprende:

a) poner en contacto un biosensor de la invención con una muestra biológica aislada de un sujeto, y

b) detectar el indicador en el medio,

en donde

- 5 - la presencia del indicador en el medio es indicativa de que el sujeto sufre una enfermedad causada por *S. aureus*.

Los términos “detectar”, “cuantificar”, “*S. aureus*” y “muestra” han sido definidos y explicados en aspecto inventivos anteriores, y dichas definiciones y las realizaciones
10 particulares de los mismos son aplicables al método de diagnóstico de la invención. Enfermedades causadas por *S. aureus* han sido ejemplificadas en aspectos inventivos anteriores y dichos ejemplos y las realizaciones particulares de los mismos son aplicables al método de diagnóstico de la invención.

15 Así, en una realización preferida del método de diagnóstico de la invención, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra alimentaria, una muestra ambiental o una muestra clínica, más preferiblemente, la muestra clínica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

20

En otra realización preferida del método de diagnóstico de la invención, la enfermedad causada por *S. aureus* se selecciona del grupo que consiste en: síndrome de la piel escaldada por estafilococo, intoxicación alimentaria, Síndrome de *shock*-tóxico estafilocócico, absceso cutáneo, impétigo, foliculitis, ántrax (forunculosis), celulitis de
25 cara y cuello, hidradenitis supurada, mastitis, bacteremia, sepsis, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis, artritis séptica, meningitis, peritonitis, pericarditis, piominitis y síndrome de coagulación intravascular diseminada.

30 En otra realización preferida del método de diagnóstico de la invención, el sujeto es ser humano.

En otra realización preferida del método de diagnóstico de la invención, previamente a la etapa a), el método comprende mezclar la muestra con una disolución tampón. En otra realización más preferida, la “disolución tampón” es solución tampón de fosfato
35 (PBS en la sigla en inglés). En otra realización preferida, el pH del medio es de 6,5 a

8,5, preferiblemente pH de 7 a 8, aún más preferiblemente pH 7,5.

Tal como se usa en la presente descripción, la expresión “la presencia del indicador en el medio es indicativa de que el sujeto sufre una enfermedad causada por *S. aureus*”
5 se refiere a que debido a la interacción del aptámero del biosensor de la invención con las células de *S. aureus*, el indicador es liberado por los poros hacia el medio de ensayo, revelando la presencia en dicho medio de células de *S. aureus*, y por asociación la enfermedad causada por el agente patógeno *S. aureus*.

10 Kit de la invención y sus usos

La puesta en práctica de los usos y los métodos de la invención comprende el empleo del biosensor de la invención, el cuál puede estar formando parte de un kit.

15 Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit, de ahora adelante el “kit de la invención”, que comprende el biosensor de la invención. Además del biosensor, el kit puede comprender otros componentes útiles en la puesta en práctica de la presente invención, tales como, buffers, vehículos de entrega, soportes del material, componentes de controles positivos y/o negativos, etc. Opcionalmente,
20 tales controles comprenden el biosensor de la invención con modificaciones para su uso como controles, por ejemplo, aptámeros que no reconocen *S. aureus*. Además de los componentes mencionados, los kits podrán incluir también instrucciones para practicar el objeto de la invención. Estas instrucciones pueden ser presentes en los kits mencionados en una variedad de formas, uno o más de los cuales pueden estar
25 presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., una hoja o hojas de papel en las que se imprime la información, en el embalaje del kit, en un inserto de paquete, etc. Otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, un CD, un USB, etc., en el que se haya registrado la información. Otro medio que puede estar
30 presente es una dirección de sitio web que puede utilizarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio remoto. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para la
35 detección y/o cuantificación de *S. aureus* en una muestra.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para diagnosticar *in vitro* una enfermedad causada por *S. aureus* en un sujeto.

5 Los términos “detección”, “cuantificación”, “diagnóstico”, “muestra” y “sujeto” han sido definidos en otros aspectos de la presente invención y son aplicables al kit de la invención y sus usos. Asimismo, las realizaciones preferidas de dichos términos también son aplicables al kit de la invención y sus usos. Por lo tanto, en una realización preferida, la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, 10 suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal. Enfermedades causadas por *S. aureus* han sido ejemplificadas en aspectos inventivos anteriores y dichos ejemplos y las realizaciones particulares de los mismos son aplicables al kit de la invención y sus usos. Así, en otra realización preferida, la enfermedad causada por *S. aureus* se selecciona del grupo consiste en: síndrome de la piel escaldada por 15 estafilococo, intoxicación alimentaria, Síndrome de *shock-tóxico* estafilocócico, absceso cutáneo, impétigo, foliculitis, ántrax (forunculosis), celulitis de cara y cuello, hidradenitis supurada, mastitis, bacteremia, sepsis, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis, artritis séptica, meningitis, peritonitis, pericarditis, piomiasis y síndrome de coagulación intravascular diseminada. En otra realización preferida, el sujeto es un 20 ser humano.

Método de preparación el biosensor de la invención

Otro aspecto de la presente invención es un método de preparación del biosensor de 25 la invención que comprende:

- a) Introducción del indicador en el soporte poroso,
- b) Funcionalización del material de la etapa a) mediante la unión de un grupo orgánico neutro o catiónico a la superficie, y
- c) Adición del aptámero que reconoce *S. aureus*.

30

En una realización preferida del método de preparación del biosensor de la invención, entre el paso b) y c), se derivatiza el grupo orgánico neutro o catiónico unido a la superficie del material de la etapa a),

35 En los Ejemplos 1 a 4 de la presente descripción se describe en detalle cómo llevar a

cabo el método de preparación del biosensor de la invención.

Realizaciones particulares del método de preparación del biosensor de la invención son todas aquellas realizaciones particulares del biosensor de la invención, tales como las descritas previamente en la presente descripción:

- 5 - el aptámero está anclado a la superficie del soporte poroso a través de un grupo orgánico polar derivatizado con un oligonucleótido de unión, en donde la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido de unión es parcialmente complementaria al aptámero, y/o
- 10 - el grupo orgánico polar es un grupo orgánico neutro o catiónico, y/o
- el grupo orgánico neutro se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico (-COOH), alcohol (-OH), aldehído (-CHO), alqueno, alquino, amina (-NH₂ ó -NR`R``), amida (-C(O)NR`R``), azida (-N₃), cetona (-C=O), éster (-COOR`), éter (R`-O-R``), halógeno, imina (RR'C=NR"), isocianato (-NCO), isotiocianato (-N=C=S), nitrilo (-C≡N), nitro (-NO₂) y tiol (-SH), siendo R una etiqueta genérica para una cadena lateral, sustituyente o grupo químico unido a uno de los grupos funcionales principales descritos, y/o
- 15 - el grupo orgánico catiónico se selecciona del grupo que consiste en aminas, grupos guanidinio ([CH₆N₃]⁺), fosfonio (PH₄⁺) o de amonio cuaternario (NR₄⁺), en donde R se selecciona entre alquilo C₁-C₃₀ lineal o ramificado y cicloalquilo C₃-C₆, y/o
- el grupo orgánico polar está derivatizado con un oligonucleótido de unión que comprende la secuencia NH₂-(CH₂)₆-SEQ ID NO: 1, y/o
- el aptámero comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 y/o
- 25 - el indicador es rodamina B, y/o
- el soporte poroso es microporoso, mesoporoso o macroporoso, y/o
- el tamaño medio de los poros del soporte poroso es de entre aproximadamente 2 y 100 nm, más preferiblemente de entre aproximadamente 2 y 50 nm, y/o
- el soporte poroso es dióxido de silicio o alúmina.

30

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y

35

no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Fig. 1.** Diagrama del biosensor de la invención y la sucesión de eventos en presencia de *S. aureus*.

Fig. 2. Imagen de FESEM del material NAA y del sólido S2.

10 **Fig. 3.** Estudio de liberación de rodamina B desde el material de la invención en presencia de 10^2 UFC/mL de *S. aureus* y (b) en ausencia de *S. aureus*.

Fig. 4. Liberación de rodamina B desde el material de la invención en presencia de diferentes concentraciones de *S. aureus*. Los ensayos se realizaron a 60 min en PBS
15 a pH 7,5.

Fig. 5. Liberación de rodamina B desde el material de la invención en presencia de 10^2 UFC/mL de *S. aureus*, *S. conhii*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. carnosus*, *S. saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S.*
20 *hominis* y *S. warneri*. Los ensayos se realizaron a 60 min en PBS a pH 7,5.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los
25 inventores, que ponen de manifiesto la preparación y el funcionamiento del biosensor de la invención y su efectividad para la detección de *Staphylococcus aureus*.

Materiales e Instrumentación

Para la preparación de los materiales porosos se empleó un agitador magnético
30 termostático y material de vidrio y plástico habitual. Todos los reactivos utilizados para la preparación de los materiales se emplearon tal cual se recibieron de las casas comerciales sin ninguna purificación extra. Los materiales obtenidos se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDX) y espectroscopia de
35 fluorescencia. Las imágenes de FESEM y el análisis EDX se obtuvieron con un

microscopio ULTRA 55 (Zeiss). Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un fluorímetro de microplacas Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA).

Ejemplo 1: Síntesis del sólido S1

5 10 placas independientes de alúmina mesoporosa (2 mm de diámetro y 0,1 mm de altura) se sumergieron en una disolución que contenía 8 mL de acetonitrilo y rodamina B a 1 mM, dejando la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación se añadieron 40 µL por placa de (3-isocianatopropil) trietoxisilano (1,25 µM) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5,5 horas. El sólido obtenido
10 se caracterizó mediante las técnicas de FESEM y EDX y se identificó como S1.

Ejemplo 2: Síntesis del sólido S2

4 placas independientes de S1 se sumergieron en 700 µL de una disolución de acetonitrilo con rodamina B (1 mM) y se añadieron 100 µL del oligonucleótido de
15 unión (NH₂-(CH₂)₆-SEQ ID NO: 1 (5'-AAA AAA CCC CCC-3')) a 100 µM. A esta mezcla se le adicionó 2 µL de trietilamina (catalizador para favorecer la formación del enlace urea) y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 3 horas. El sólido S2 obtenido se caracterizó mediante las técnicas de FESEM (Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo) y EDX (Energy Dispersive X-ray spectroscopy).

20

Ejemplo 3: Síntesis del sólido S3 (el biosensor de la invención)

2 placas independientes de sólido S2 se sumergieron en 90 µL de una disolución de tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,5 conteniendo 10 µL del oligonucleótido SEQ ID
25 NO: 2 (5'-TTT TGG GGG GTC CCT ACG GCG CTA ACC CCC CCA GTC CGT CCT CCC AGC CTC ACA CCG CCA CCG TGC TAC AAC GGG GGG TTT T-3')) a 100 µM y se dejó agitar a durante 2 horas a una temperatura de 30°C. A continuación se lavó en sólido con la disolución tamponada de PBS gota a gota y se obtuvo el sólido S3, el biosensor de la invención, el cual se caracterizó mediante las técnicas de FESEM y EDX.

30

Ejemplo 4: Caracterización de los materiales obtenidos

Los soportes de alúmina porosa consistieron en una película anódica de óxido de aluminio sobre una capa de aluminio de 0,1 mm de espesor con una densidad de poros de $9 \cdot 10^{11}$ cm⁻² y poros de 5 nm de diámetro y longitud de 10 µm. En la Figura 2A
35 se muestran las imágenes obtenidas mediante FESEM, donde puede visualizarse la

superficie porosa de las placas de alúmina. Asimismo, las imágenes de FESEM del material S3 muestran la existencia de una capa de materia orgánica sobre la superficie del material, mientras que la existencia de poros en ciertas áreas confirma la conservación de la estructura porosa a lo largo de la síntesis del biosensor de la invención (Figura 2B).

El contenido de materia orgánica correspondiente a los distintos sólidos fue determinado por análisis EDX. Mediante esta técnica, se confirmó la presencia de átomos de carbono, nitrógeno y fósforo correspondiente a las moléculas de rodamina B, 3-isocianatopropil y oligonucleótidos de cada uno de los materiales. Los valores obtenidos de C, N y P en referencia al contenido de átomos de aluminio (C/AI, N/AI y P/AI) se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Contenido materia orgánica de los distintos sólidos

	C/AI	N/AI	P/AI
S1	1,42	-	-
S2	0,10	ND	ND
S3	0,24	0,04	0,01

Ejemplo 5: Comportamiento del biosensor de la invención en presencia de células de *S. aureus*.

2 placas independientes del biosensor de la invención se sumergieron en 900 μ L de disolución tampón a pH 7,5 (PBS) cada una. A una de ellas se le añadieron 100 μ L de la disolución tamponada (curva a de la Figura 3) y a la otra se le añadieron 100 μ L de una suspensión bacteriana de *S. aureus* a una concentración de 10^3 UFC/mL (curva b de la Figura 3). En ausencia del analito diana no se observó liberación del colorante en función del tiempo (Figura 3 curva a). En cambio, en presencia de *S. aureus* se observó una liberación del colorante, tal y como muestra la curva b de la Figura 3.

Ejemplo 6: Comportamiento del biosensor de la invención en presencia de diferentes concentraciones de *S.aureus*.

6 biosensores de la invención se sumergieron individualmente en 900 μ L de disolución tampón a pH 7,5 (PBS) y a una de ellas se le añadieron 100 μ L de diluciones seriadas de una suspensión bacteriana de *S. aureus* hasta alcanzar las concentraciones finales

comprendidas en el rango de 10^3 y 10^{-5} UFC/mL. Tal y como se observa en la Figura 4, la cantidad de indicador liberado a los 60 minutos de ensayo es proporcional a la concentración de bacteria presente en el medio, estableciéndose un límite de detección de 2 UFC/mL.

5

Ejemplo 7: Comportamiento del biosensor de la invención en presencia de otras especies de *Staphylococcus*.

La Figura 5 muestra la rodamina B liberada del material S3 (biosensor de la invención) en presencia de diferentes especies del género *Staphylococcus* (*Staphylococcus conhii*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus carnosus*,
10 *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus hominis* y *Staphylococcus warneri*). Como se puede observar, solo se produce liberación de rodamina B en presencia *S. aureus*, demostrándose la alta selectividad
15 que se alcanza con el biosensor de la invención.

Ejemplo 8: Comportamiento del biosensor de la invención en presencia de muestras clínicas de pacientes infectados por *S. aureus*.

Se realizó la validación del sistema en muestras clínicas reales. Concretamente, se
20 analizó la presencia de *S. aureus* en 25 muestras de hemocultivo de pacientes con sospecha de infección por *S. aureus*. Todas las muestras fueron analizadas en paralelo por el servicio de microbiología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Tal y como muestra la Tabla 2, el biosensor de la invención consiguió identificar el 100% de las muestras infectadas.

Tabla 2: Validación del método de diagnóstico de la invención en muestras reales de hemocultivos de pacientes con sospecha de infección por *S. aureus*.

# Muestra	Método de referencia (hemocultivo) ^a	S3 ^b
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	- ^c	- ^c
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-
25	-	-

a) Se considera positivo (+) cuando de las muestras de sangre se aísla alguna colonia de *S. aureus*.

5 b) Se considera positivo (+) cuando la intensidad de fluorescencia a 575 nm ($\lambda_{exc} = 555$ nm) es igual o mayor que 3 veces la desviación estándar de 3 controles negativos.

c) Negativo para *S. aureus* y positivo para *S. lugdunensis*.

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor que comprende
- un soporte poroso que comprende un indicador en el interior de los poros, y
 - 5 - un aptámero que reconoce de forma específica *Staphylococcus aureus*,
en donde
 - una pluralidad de poros que comprenden un acceso al exterior del soporte poroso, y
 - el aptámero está anclado a la superficie del soporte poroso en una posición tal
 - 10 que
 - (i) en ausencia de *S. aureus*, el aptámero impide la salida del indicador del soporte poroso, y
 - (ii) en presencia de *S. aureus*, el aptámero reconoce y se une a dicha bacteria, permitiendo la salida del indicador del soporte poroso.
 - 15
2. Biosensor según la reivindicación 1, en donde el aptámero está anclado a la superficie del soporte poroso a través de un grupo orgánico polar derivatizado con un oligonucleótido de unión, en donde la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido de unión es parcialmente complementaria al aptámero.
- 20
3. Biosensor según la reivindicación 1 o 2, en donde el grupo orgánico polar es un grupo orgánico neutro o catiónico.
4. Biosensor según la reivindicación 3, en donde el grupo orgánico neutro se
- 25 selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico (-COOH), alcohol (-OH), aldehído (-CHO), alqueno C₂-C₃₀, alquino C₂-C₃₀, amina (-NH₂ ó -NR'R''), amida (-C(O)NR'R''), azida (-N₃), cetona (-C=O), éster (-COOR'), éter (R'-O-R''), halógeno, imina (RR'C=NR''), isocianato (-NCO), isotiocianato (-N=C=S), nitrilo (-C≡N), nitro (-NO₂) y tiol (-SH), preferiblemente isotiocianato (-N=C=S), representando cada R' y R'',
- 30 de manera independiente, un hidrógeno, un alquilo C₂-C₃₀, un alqueno C₂-C₃₀, o un alquino C₂-C₃₀, todos estos grupos pueden ser lineales o ramificados o estar sustituidos o no sustituidos.
5. Biosensor según la reivindicación 3, en donde el grupo orgánico catiónico se
- 35 selecciona del grupo que consiste en aminas (-NH₄⁺), grupos guanidinio ([CH₆N₃]⁺),

fosfonio (-PH₄⁺) o de amonio cuaternario (-NR₄⁺), en donde cada R se selecciona independientemente entre un alquilo C₁-C₃₀, lineal o ramificado, y un cicloalquilo C₃-C₆.

5 6. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el grupo orgánico polar está derivatizado con un oligonucleótido de unión que comprende la secuencia NH₂-(CH₂)₆-SEQ ID NO: 1.

7. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el aptámero
10 comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2.

8. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el indicador es rodamina B.

15 9. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el soporte poroso es microporoso, mesoporoso o macroporoso.

10. Biosensor según la reivindicación 9, en donde el tamaño medio de los poros del soporte poroso es de entre aproximadamente 2 y 100 nm, más preferiblemente de
20 entre aproximadamente 2 y 50 nm.

11. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el soporte poroso es dióxido de silicio o alúmina.

25 12. Uso de un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la detección y/o cuantificación de *S. aureus* en una muestra.

13. Uso según la reivindicación 12, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra alimentaria o una muestra clínica, preferiblemente, la muestra
30 clínica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

14. Uso de un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para diagnosticar *in vitro* una enfermedad causada por *S. aureus* en un sujeto.

35

15. Uso según la reivindicación 14, en donde la enfermedad causada por *S. aureus* se selecciona del grupo que consiste en: síndrome de la piel escaldada por estafilococo, intoxicación alimentaria, Síndrome de *shock*-tóxico estafilocócico, absceso cutáneo, impétigo, foliculitis, ántrax (forunculosis), celulitis de cara y cuello, hidradenitis supurada, mastitis, bacteremia, sepsis, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis, artritis séptica, meningitis, peritonitis, pericarditis, piomiasis y síndrome de coagulación intravascular diseminada.

16. Uso según la reivindicación 14 o 15, en donde el sujeto es ser humano.

17. Método *in vitro* para detectar y/o cuantificar *S. aureus* en una muestra que comprende:

a) poner en contacto un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 con una muestra, y

b) detectar o medir el indicador en el medio, en donde

la presencia del indicador en el medio es indicativa de la presencia de *S. aureus* en la muestra, y/o la cantidad del indicador en el medio es proporcional a la concentración de *S. aureus* en el medio.

18. Método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad causada por *S. aureus* en un sujeto que comprende:

a) poner en contacto un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 con una muestra biológica aislada de un sujeto, y

b) detectar el indicador en el medio,

en donde la presencia del indicador en el medio es indicativa de que el sujeto sufre una enfermedad causada por *S. aureus*.

19. Método según la reivindicación 18, en donde la enfermedad causada por *S. aureus* se selecciona del grupo que consiste en: síndrome de la piel escaldada por estafilococo, intoxicación alimentaria, Síndrome de *shock*-tóxico estafilocócico, absceso cutáneo, impétigo, foliculitis, ántrax (forunculosis), celulitis de cara y cuello, hidradenitis supurada, mastitis, bacteremia, sepsis, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis, artritis séptica, meningitis, peritonitis, pericarditis, piomiasis y síndrome de coagulación intravascular diseminada.

20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en donde previamente a la etapa a), el método comprende mezclar la muestra con una disolución tampón.

5

21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra alimentaria o una muestra clínica, preferiblemente, la muestra clínica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

10

22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en donde el sujeto es ser humano.

23. Un kit que comprende un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

15

24. Uso de un kit según la reivindicación 23, para la detección y/o cuantificación de *S. aureus* en una muestra.

20 25. Uso según la reivindicación 24, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

26. Uso de un kit según la reivindicación 23, para diagnosticar *in vitro* una enfermedad causada por *S. aureus* en un sujeto.

25

27. Uso según la reivindicación 26, en donde la enfermedad causada por *S. aureus* se selecciona del grupo que consiste en: síndrome de la piel escaldada por estafilococo, intoxicación alimentaria, Síndrome de *shock*-tóxico estafilocócico, absceso cutáneo, impétigo, foliculitis, ántrax (forunculosis), celulitis de cara y cuello, hidradenitis supurada, mastitis, bacteremia, sepsis, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis, artritis séptica, meningitis, peritonitis, pericarditis, piomistitis y síndrome de coagulación intravascular diseminada.

30

28. Uso según la reivindicación 26 o 27, en donde el sujeto es ser humano.

35

29. Método para preparar un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende

- a) Introducción del indicador en el soporte poroso,
- 5 b) Funcionalización del material de la etapa a) mediante la unión de un grupo orgánico neutro o catiónico a la superficie, y
- c) Adición del aptámero que reconoce *S. aureus*.

30. Método según la reivindicación 29 donde después del paso b) y antes del paso c) se derivatiza el grupo orgánico neutro o catiónico unido a la superficie del material de
10 la etapa a).

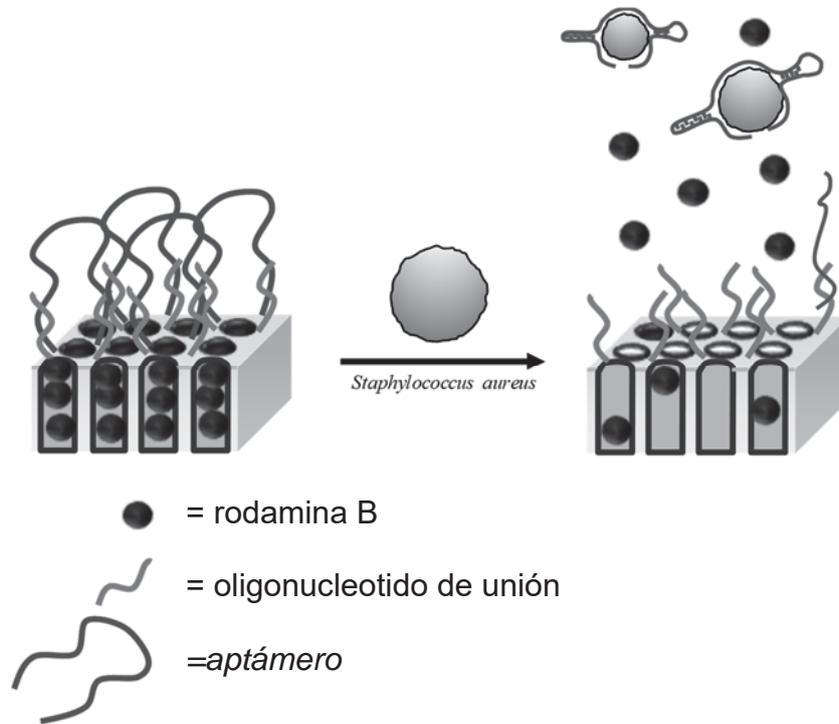


Fig. 1

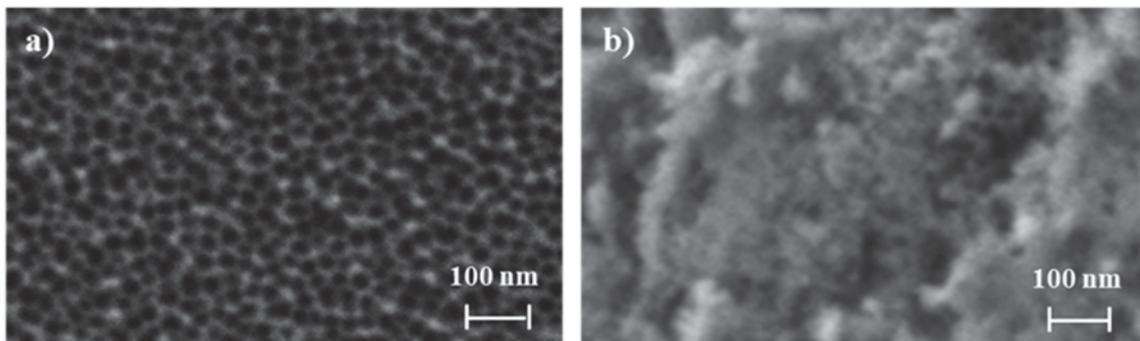


Fig. 2

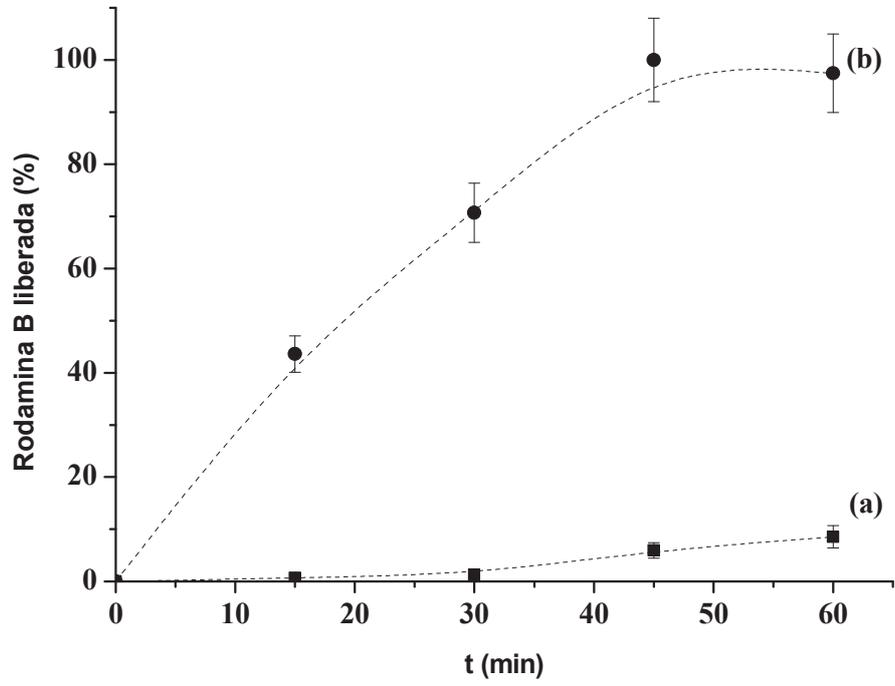


Fig. 3

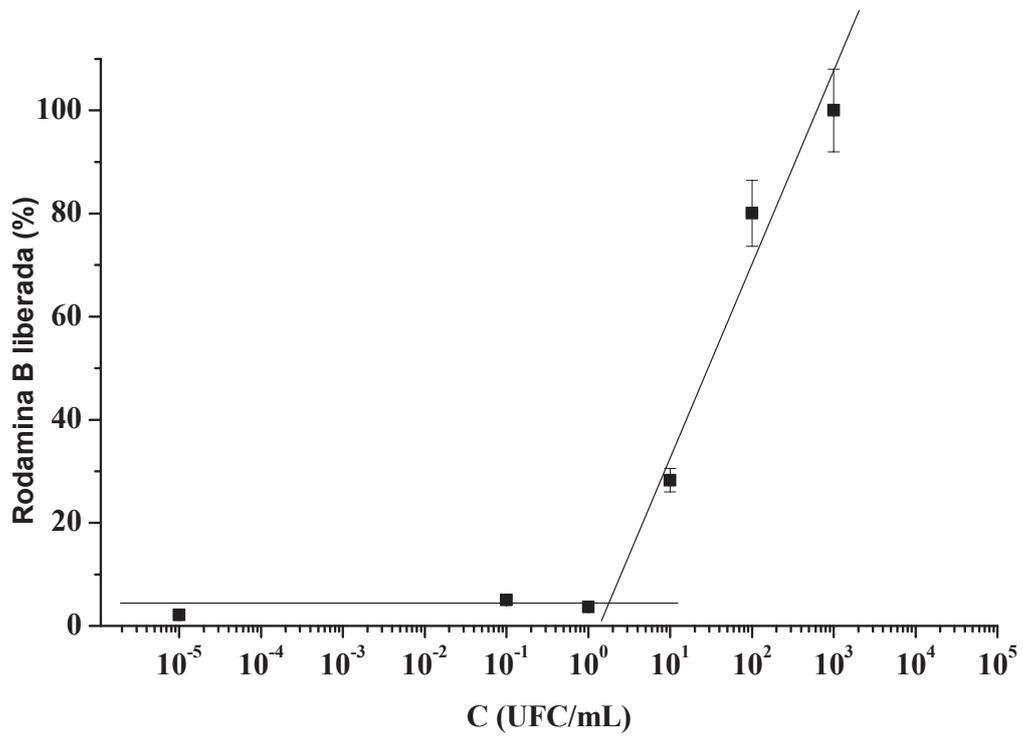


Fig. 4

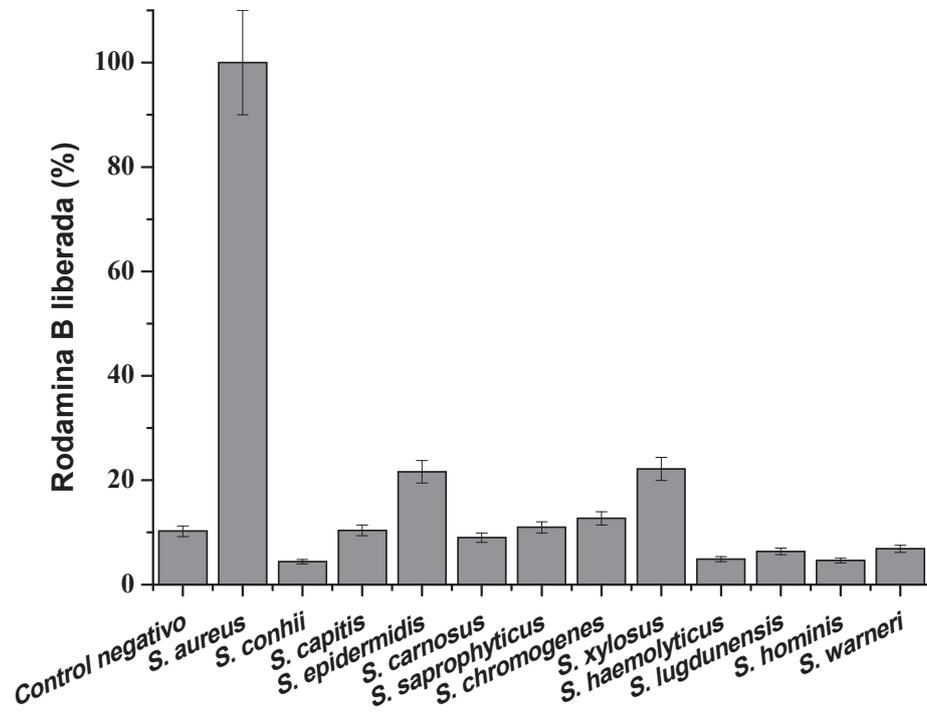


Fig. 5



- ②¹ N.º solicitud: 202030356
②² Fecha de presentación de la solicitud: 27.04.2020
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/689** (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2019048722 A1 (UNIV VALENCIA POLITECNICA <i>et al.</i>) 14/03/2019, Párrafos [0003], [0007], [0015], [0033], [0034], [0039]-[0043], [0048]-[0052], [0059], [0076], [0080], [0081], [0085], [0130], [0133]-[0134], [0091], ejemplos. 1-12, tablas 1-4, reivindicaciones 1-13.	1-30
Y	US 2015316545 A1 (PECK KONAN <i>et al.</i>) 05/11/2015, SEQ ID N°:2	1-30
A	BORSA BARIS A <i>et al.</i> "Staphylococcus aureus detection in blood samples by silica nanoparticle-oligonucleotides conjugates". Biosensors & Bioelectronics, 30/11/2016, Vol. 86, Páginas 27-32	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
08.06.2020

Examinador
M. L. Serriñá Ramírez

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, PATENW, BIOSIS, EMPASE, MEDLINE, NPL, XPESP, XPESP2