

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 764**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05804047 .8**

96 Fecha de presentación: **03.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1774041**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE LISIS DE MUESTRAS MICROBIANAS.**

30 Prioridad:
03.08.2004 US 598638 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.01.2012

73 Titular/es:
**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
4560 HORTON STREET
EMERYVILLE, CA 94608, US**

72 Inventor/es:
**FONG, Yiu-Lian y
TABRIZI, Azita**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 764 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de ácidos nucleicos mediante lisis de muestras microbianas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a procedimientos simples y rápidos para el aislamiento de ácidos nucleicos partiendo de células microbianas, particularmente células bacterianas y fúngicas, usando un procedimiento de lisis universal.

Antecedentes de la invención

10 Con el advenimiento de la biología molecular, un número creciente de procedimientos de diagnóstico se basan en la detección de ácidos nucleicos. Las tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos representan herramientas útiles en la biología molecular. Desde el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han descrito varios protocolos para el aislamiento de ácidos nucleicos que son adecuados para la detección e identificación de microorganismos. Sin embargo, la mayoría de estos protocolos requieren mucho tiempo y, frecuentemente, requieren el uso de productos químicos tóxicos. Además, los protocolos necesitan ser adaptados para cada tipo de microbio; un protocolo de lisis para hongos puede no ser adecuado para bacterias gram-negativas, o parásitos, o esporas bacterianas, etc. Además, estos protocolos requieren numerosas etapas, incrementando el riesgo de contaminación de muestra a muestra o por traspaso. Además, en muchos casos, la identidad de los microorganismos presentes en una muestra será desconocida, haciendo imposible determinar qué protocolo específico sería apropiado, siendo necesarios múltiples ensayos para una única muestra.

20 Se han descrito muchos procedimientos para alterar células microbianas, previamente a la liberación de ácidos nucleicos (véase, Hugues et al. *Methods in Microbiology*, 1971, vol. 5B, Academic Press, Nueva York, para una revisión de estos procedimientos). El procedimiento seleccionado dependerá de su capacidad para procesar muestras de un cierto tamaño o su capacidad para procesar múltiples muestras en un periodo de tiempo razonable, mientras los ácidos nucleicos retienen su integridad. Los procedimientos físicos clásicos de rotura de células incluyen la desintegración celular mecánica (trituration y molido, molido en húmedo, ultrasonidos, cizalla hidráulica, presión por congelación), cizalla líquida o hidrodinámica (prensa francesa, prensa Chaikoff, homogeneizadores, molinos húmedos, molinos de vibración, filtros, desintegración por ultrasonidos) y cizalla sólida (molido, prensa Hugues). Los procedimientos químicos y biológicos de desintegración de células están dirigidos, en su mayoría, a modificar la pared celular o membrana citoplasmática, o ambas, de manera que las células tengan fugas o revienten debido a los efectos de la presión de turgencia. Los procedimientos incluyen ósmosis, secado y extracción, autólisis, inhibición de síntesis de la pared celular, ataque enzimático sobre paredes celulares, bacteriófagos y otros factores líticos y radiación ionizante.

30 Muchos de los procedimientos de aislamiento de plásmidos o ADN genómico de bacterias usan lisozima u otras enzimas líticas (tales como mutanolisina o lisostafina) para conseguir la lisis enzimática de bacterias, para recuperar el ácido nucleico del lisado de células. De manera similar, muchos de los procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos de levadura (ADN genómico o plásmido de ADN) implican el uso de fuerza mecánica de cizalladura o digestión enzimática con enzimas tales como liticasa, zimolasa o quitinasa, para romper la pared celular de la levadura para permitir el aislamiento de los ácidos nucleicos. Se conoce que la lisozima puede romper efectivamente la pared celular bacteriana, escindiendo los enlaces β -1,4-glicosídicos entre N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico en peptidoglicano, el componente estructural principal de la pared celular bacteriana. También está bien documentado que la liticasa puede degradar efectivamente la pared celular de las levaduras, principalmente a través de la actividad β -1,3-glucanasa. Se ha demostrado que muchas de estas enzimas hidrolíticas tienen una actividad óptima en la presencia de iones metálicos divalentes, tales como Mg^{++} , Ca^{++} , etc. Está bien documentado que la actividad liticasa requiere un agente reductor, tal como β -mercaptoetanol o DTT, para lisar efectivamente la pared celular de las levaduras. EDTA es un quelante de metales bien conocido, que es muy efectivo en el debilitamiento de la membrana celular externa de la bacteria, mediante la quelación de Mg^{++} y Ca^{++} , que son elementos esenciales que mantienen la estructura de las membranas enlazando LPS (lipopolisacárido) y proteínas entre sí.

45 El documento WO 03/097831 divulga un procedimiento de lisis de levadura en el que las células son puestas en contacto con 0,1 M EDTA, 14 mM mercaptoetanol y 100 U liticasa.

50 Hay una serie de kits disponibles en el mercado para el aislamiento o la detección de ácidos nucleicos, partiendo de varias fuentes celulares o virales. Típicamente, una primera etapa en cualquier procedimiento de aislamiento o de detección de ácido nucleico de una célula microbiana, implica la ruptura (lisis) de la pared celular y las membranas, para permitir que el contenido celular (incluyendo el contenido nuclear, si está presente) sea liberado al medio. Esta lisis celular puede conseguirse usando enzimas de lisis de los tipos descritos anteriormente. Debido a los diferentes requisitos de las enzimas de lisis usadas, la mayoría de los kits disponibles comercialmente están diseñados específicamente para aislar ácido nucleico de bacterias o levadura. Aunque hay algunos kits disponibles, que están diseñados para su uso con células de bacterias y levadura, estos emplean, generalmente, procedimientos mecánicos de rotura (por ejemplo, molido o agitación vortical con perlas de vidrio) y/o el uso de solventes orgánicos para la

extracción o la precipitación y, por lo tanto, no son adecuados para la automatización.

Sigue existiendo la necesidad de un procedimiento simple, rápido y ampliamente aplicable y automatizable para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de una variedad de microorganismos. Dicho procedimiento requiere un procedimiento de lisis que pueda ser aplicado a cualquier microorganismo presente en una muestra.

5 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos de rotura simple y rápida de células microbianas, para permitir la liberación de los ácidos nucleicos microbianos en una suspensión o muestra líquida. Los procedimientos de la invención pueden ser aplicados a muchos tipos diferentes de microorganismos, incluyendo diversas especies bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas), especies de hongos y virus, así como mezclas de estos microorganismos. El procedimiento es llevado a cabo con un mínimo de manipulación y, en una realización preferente, puede ser realizado en un único recipiente de reacción. El procedimiento no requiere una manipulación por separado para los diferentes tipos de microorganismos. El procedimiento de lisis de la invención es particularmente útil en un procedimiento para determinar la presencia de contaminación microbiana de una muestra, particularmente una muestra biológica (por ejemplo, sangre, plaquetas, concentrados de hematíes, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, fluidos de tejidos, los líquidos intersticiales, saliva, frotis vaginales, dentales, uterinos o rectales, lavado, esputo, biopsias de órganos o tejidos). Otros tipos de muestras son igualmente adecuados para su uso en el procedimiento de lisis, con la condición de se conozca o se sospeche que la muestra contiene microorganismos y que pueda ser preparada como una muestra líquida o suspensión (por ejemplo, muestras de agua de una planta de tratamiento de agua, soluciones o suspensiones farmacéuticas, frotis de superficies inertes o alimentos procesados, tales como leche, zumos de frutas y otras bebidas, carnes, etc.)

El procedimiento de la invención, según se define en las reivindicaciones, utiliza una mezcla de enzimas y una alta concentración de un agente quelante para conseguir la ruptura celular de cualquier tipo de microorganismo. No se necesitan detergentes, agentes estabilizadores o agentes reductores para conseguir la ruptura de las células microbianas y permitir la liberación de los ácidos nucleicos, aunque dichos componentes pueden ser añadidos. En realizaciones adicionales, el procedimiento incluye el tratamiento de la muestra de células microbianas lisadas con una proteasa, para reducir la cantidad de proteína en la muestra de células microbianas lisadas y para facilitar el aislamiento de los ácidos nucleicos liberados. El ácido nucleico liberado puede ser aislado adicionalmente mediante cualquier técnica conveniente. Una técnica particularmente preferente usa un agente caotrópico, un detergente y un soporte sólido de unión a ácido nucleico y, opcionalmente, un alcohol, tal como etanol o isopropanol. Varios kits están disponibles comercialmente para este propósito.

Debido a que el procedimiento de la invención puede ser usado en una diversidad de tipos de microorganismos, el mismo puede ser realizado en un único recipiente de reacción y no requiere ningún procedimiento mecánico o físico de cizallamiento, se adapta fácilmente a los sistemas automatizados de manipulación de muestras. Es particularmente adecuado para sistemas automatizados de alto rendimiento para la detección de contaminación microbiana, que utilizan ensayos de ácido nucleico (NAT).

Descripción detallada

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento, por parte de los presentes inventores, de que las técnicas convencionales para la ruptura de células microbianas y la liberación concomitante de ácidos nucleicos y otros contenidos celulares podrían ser simplificadas en un único procedimiento, ampliamente aplicable, adecuado para la ruptura de una amplia diversidad de microorganismos.

Los presentes inventores han descubierto condiciones que son adecuadas para la ruptura enzimática simultánea de células bacterianas y levaduras, permitiendo la liberación de ácidos nucleicos de ambos tipos de células en una única reacción. El procedimiento sólo requiere una alta concentración de un agente quelante y una mezcla de enzimas de lisis adecuadas para la digestión de cada tipo de célula (es decir, para bacterias y levadura). No se necesitan ni agente reductor (tal como β -mercaptoetanol, ditioneitol o ditioeritritol) ni agente estabilizador (por ejemplo, sorbitol). En algunas aplicaciones, la introducción de un detergente permitirá la solubilización de las membranas celulares y facilitará la liberación de los ácidos nucleicos desde las células lisadas.

El procedimiento descrito en la presente memoria comprende: proporcionar una muestra líquida o una suspensión para la evaluación de una posible contaminación microbiana; produciendo una composición de lisis de muestra (1) añadiendo a la muestra un agente quelante y (2) añadiendo a la muestra una mezcla de enzimas de lisis; e incubar la muestra durante un tiempo y a una temperatura suficientes para producir una muestra microbiana lisada y permitir, de esta manera, la liberación de los ácidos nucleicos microbianos. En realizaciones adicionales, la muestra puede ser tratada con una proteasa, para digerir cualquier proteína presente en la muestra microbiana lisada, y los ácidos nucleicos liberados pueden ser aislados y purificados adicionalmente, usando técnicas estándar. Además, los ácidos nucleicos purificados pueden ser detectados y/o analizados mediante cualquier técnica de detección convencional.

- 5 "Muestra líquida" significa una muestra que está en un estado líquido, por ejemplo, una sustancia en un estado fluido con un volumen fijo, pero sin forma fija. Las muestras líquidas pueden incluir, pero no se limitan a, sangre, suero, plasma, orina, fluidos corporales, muestras de frotis (obtenidas frotando una superficie de interés y colocando el frotis en tampón o medios de frotis comunes), tampones o productos alimenticios fluidos procesados, tales como leche, zumos u otras bebidas.
- "Suspensión" significa una muestra en la que hay partículas suspendidas en un líquido, y puede incluir, pero no se limita a, suspensiones de células sanguíneas u otros tipos de células o homogeneizado tisular, en el que las muestras de tejido son maceradas en tampones acuosos, o suspensiones de partículas, tales como material de soporte para cromatografía en soluciones acuosas de tampón.
- 10 La muestra líquida puede ser centrifugada durante 10 minutos a $\geq 5.000 \times g$ y puede ser resuspendida en una solución que contiene el agente quelante. En una realización preferente, el agente quelante es añadido a una concentración final de entre 0,3 y 0,5 M EDTA. En los casos en los que la muestra ya está concentrada, tales como sangre entera, la muestra puede no necesitar centrifugación y el agente quelante puede ser añadido directamente a la muestra concentrada. La mezcla de enzimas de lisis es añadida, a continuación, y la muestra líquida es incubada durante un tiempo suficiente y a una temperatura suficiente para producir una muestra de células microbianas lisadas, en la que los ácidos nucleicos microbianos han sido liberados desde las células microbianas. En una realización preferente, la mezcla de enzimas de lisis comprende al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en lisozima, lisostafina y mutanolisina, y al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en liticasa y zimoliasa. En una realización preferente, la muestra es incubada durante 10 a 60 minutos a una temperatura entre 25°C y 37°C.
- 15 Opcionalmente, una proteasa (por ejemplo, proteinasa K) puede ser añadida con, o después de la adición de, la mezcla de enzimas de lisis. La proteasa que contiene la muestra microbiana lisada es incubada, preferentemente, entre 50°C y 65°C. El procedimiento descrito en la presente memoria puede comprender la etapa adicional de aislar los ácidos nucleicos microbianos liberados usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como la unión de los ácidos nucleicos microbianos liberados a un soporte de unión de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, los kits MagAttract DNA o EZ-1 DNA de Qiagen, o los kits Mag de aislamiento de ADN de Agowa). Preferentemente, los ácidos nucleicos microbianos aislados pueden ser detectados o analizados, a continuación, usando cualquier técnica de detección convencional, conocida en la materia, por ejemplo, técnicas de amplificación, tales como PCR, TMA, NASBA, RT-PCR, seguido opcionalmente por un análisis de secuencia, si se desea.
- 20 Típicamente, el agente quelante es proporcionado en una solución acuosa concentrada cuyo pH está ajustado con pequeñas cantidades de ácido o de base concentrada, según sea apropiado, para conseguir un pH en el intervalo fisiológico. Como alternativa, puede usarse cualquiera de entre diversos tampones conocidos para ajustar el pH. El agente quelante tendrá un pH de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,0, preferentemente un pH de aproximadamente 7,5 +/- 0,1 unidades de pH.
- 30 Preferentemente para las composiciones y los procedimientos de la presente invención, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)tetraacético (EGTA), o sus sales; más preferentemente, el agente quelante es EDTA. Los términos "EDTA" y "EGTA" se usarán para hacer referencia tanto a la forma ácido como a la forma sal, y cualquiera de las formas puede ser usada en la presente invención, aunque las formas de sal son preferentes.
- 35 "Alta concentración de un agente quelante" significa una concentración final de al menos 0,3 M a al menos 0,5 M. Preferentemente, el agente quelante está presente en los procedimientos de la presente invención a una concentración de entre 0,4 M y 0,5 M.
- 40 "Enzima de lisis" significa cualquiera de una serie de enzimas bien conocidas que actúan digiriendo los componentes de las paredes celulares microbianas, causando, de esta manera, la ruptura o lisis de la célula. Los ejemplos de enzimas de lisis incluyen, pero no se limitan a, liticasas, quitinasas, zimolasas, gluculasas, lisozimas, lisostafinas y mutanolisinas. En una realización, la mezcla de enzimas de lisis en la presente composición y procedimientos comprenderá al menos una enzima de lisis que tiene actividad glucanasa contra paredes celulares fúngicas (por ejemplo, levadura) y al menos una enzima que tiene actividad glicolítica contra peptidoglicanos de las paredes celulares bacterianas. En otra realización, la mezcla de enzimas de lisis comprenderá al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en una liticasa, una zimolasa y enzimas hidrolíticas que tienen actividad β -1,3-glucanasa, actividad β -1,4-glucanasa o actividad β -1,6-glucanasa, y al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en una lisozima, una mutanolisina y una lisostafina. En una realización preferente, la composición de lisis de la invención consiste esencialmente en una alta concentración de un agente quelante y una mezcla de una liticasa y/o una zimolasa combinada con una lisozima y/o una mutanolisina y/o una lisostafina. Todas estas enzimas son bien conocidas y fácilmente disponibles en una diversidad de fuentes comerciales.
- 45 La adición de detergente es opcional y puede realizarse antes, después o con la adición de un agente quelante y/o la mezcla de enzimas de lisis. Cualquiera de entre diversos detergentes bien conocidos para solubilizar la membrana celular son adecuados, incluyendo, pero sin limitarse a, Triton X-100, Tween 20, NP-40 y SDS.
- 50

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la ruptura de células microbianas para permitir la liberación de ácidos nucleicos desde las células microbianas presentes en una muestra, según se define en las reivindicaciones, que comprende: proporcionar una muestra que contiene o se sospecha que contiene células microbianas, en la que la muestra es una muestra líquida o una suspensión, y producir una composición de lisis de la muestra (1) añadiendo un agente quelante a la muestra, a una concentración final de entre 0,3 M y 0,5 M, (2) añadiendo a la muestra una mezcla de enzimas de lisis, e incubando la muestra durante un tiempo suficiente y a una temperatura para producir una muestra microbiana lisada y para permitir, de esta manera, la liberación de los ácidos nucleicos microbianos. El agente quelante y la mezcla de enzimas de lisis son tal como se ha descrito anteriormente para la composición de lisis. Típicamente, la composición de lisis de la muestra contendrá sólo la muestra, el agente quelante y la mezcla de enzimas de lisis y no contendrá, típicamente, agente estabilizador o agente reductor. La composición de lisis de la muestra no contendrá, típicamente, ningún catión metálico divalente añadido (aunque una pequeña cantidad puede estar presente, inicialmente, en las muestras). El agente quelante y la mezcla de enzimas de lisis pueden ser añadidos a la muestra secuencialmente, en cualquier orden, o pueden ser añadidos de manera simultánea. El agente quelante y la mezcla de enzimas de lisis pueden ser combinados y añadidos a la muestra en una única etapa. La concentración final de agente quelante en la composición de lisis de la muestra estará entre 0,3 M y 0,5 M, más preferentemente, la concentración final de agente quelante en la composición de lisis de la muestra estará entre aproximadamente 0,4 M y aproximadamente 0,5 M. Los agentes quelantes preferentes son EDTA y EGTA. En algunas realizaciones, la composición de lisis de la muestra puede contener un detergente (por ejemplo, Triton X-100, Tween 20, NP-40 o SDS) para facilitar la solubilización de las membranas celulares.

En una realización preferente, la mezcla de enzimas de lisis comprende preferentemente, o consiste esencialmente en, una liticasa y/o una zimolasa y una lisozima y/o una mutanolisina y/o una lisostafina. De esta manera, las mezclas de enzimas de lisis preferentes contienen liticasa y lisozima, o liticasa y mutanolisina, o liticasa y lisostafina, o zimolasa y lisozima, o zimolasa y mutanolisina, o zimolasa y lisostafina, o liticasa, zimolasa y lisozima, o liticasa, zimolasa y mutanolisina, o liticasa, zimolasa y lisostafina, o liticasa, lisozima y mutanolisina, o zimolasa, lisozima y mutanolisina, o liticasa, lisozima, lisostafina y mutanolisina, o zimolasa, lisozima, lisostafina y mutanolisina, o liticasa, zimolasa, lisozima y mutanolisina, o liticasa, zimolasa, lisozima, lisostafina y mutanolisina, etc.

Según se define en las reivindicaciones, el procedimiento comprende: proporcionar una muestra líquida o suspensión que contiene o se sospecha que contiene células microbianas; producir una composición de lisis de la muestra (1) añadiendo un agente quelante a la muestra hasta una concentración final de entre aproximadamente 0,3 M y 0,5 M, y (2) añadiendo a la muestra una mezcla de enzimas de lisis, e incubando la muestra durante un tiempo suficiente y a una temperatura para producir una muestra microbiana lisada y para permitir, de esta manera, la liberación de los ácidos nucleicos microbianos.

El procedimiento puede comprender: proporcionar una muestra líquida o suspensión que contiene o se sospecha que contiene células microbianas; producir una composición de lisis de la muestra (1) añadiendo un agente quelante a la muestra a una concentración final de entre aproximadamente 0,3 M y 0,5 M, y (2) añadiendo a la muestra una mezcla de enzimas de lisis, en la que la mezcla de enzimas de lisis consiste esencialmente en al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en liticasa y zimolasa, y al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en lisozima, lisostafina y mutanolisina, e incubando la muestra durante un tiempo y a una temperatura suficientes para producir una muestra microbiana lisada y para permitir, de esta manera, la liberación de los ácidos nucleicos microbianos.

Las condiciones de temperatura y tiempo de incubación suficientes para producir una muestra microbiana lisada pueden ser determinadas fácilmente por una persona con conocimientos en la materia y dependerán, en parte, de los requisitos de las enzimas de lisis particulares elegidas. En general, el tiempo de la etapa de incubación es de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 minutos, preferentemente entre 30 y 60 minutos, a temperaturas entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 37°C, preferentemente, será adecuado entre 30-37°C.

En una realización adicional, el procedimiento comprende: proporcionar una muestra líquida o suspensión que contiene o se sospecha que contiene células microbianas; producir una composición de lisis de la muestra (1) añadiendo un agente quelante de la muestra a una concentración final de entre 0,3 M y 0,5 M, y (2) añadiendo a la muestra una mezcla de enzimas de lisis, en la que la mezcla de enzimas de lisis consiste esencialmente en al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en liticasa y zimolasa, y al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en lisozima y mutanolisina; e incubando la muestra durante aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos y a una temperatura de entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 37°C, para producir una muestra microbiana lisada y permitir, de esta manera, la liberación de los ácidos nucleicos microbianos.

Las enzimas de lisis estarán presentes en la composición de lisis y la composición de lisis de la muestra en concentraciones suficientes para conseguir la lisis de las células microbianas presentes en la muestra. Las concentraciones adecuadas son determinadas fácilmente por una persona con conocimientos en la materia y estarán, típicamente, en el intervalo de 0,1 unidades/ml a 10⁶ unidades/ml. Sin embargo, será evidente para una persona con

5 conocimientos en la materia que los parámetros de concentración de enzimas, tiempo de incubación y temperatura de incubación, son interdependientes y pueden ser ajustados de diversas maneras para conseguir el mismo resultado o un resultado similar. Por ejemplo, una menor concentración de enzimas puede ser compensada por medio de un tiempo de incubación más largo, una temperatura de incubación más baja puede ser compensada por medio de un tiempo de incubación más largo y/o una mayor concentración de enzimas.

10 En un aspecto adicional, el procedimiento de la invención comprende además la etapa de adición de una proteasa, preferentemente, una proteasa no específica, más preferentemente, una proteinasa K, a la muestra microbiana lisada y la incubación para digerir cualquier proteína presente en la muestra de células microbianas lisadas. La proteasa puede ser añadida a la muestra después del agente quelante y la mezcla de enzimas de lisis o simultáneamente con el agente quelante o la mezcla de enzimas de lisis. Para realizar la digestión de la proteína presente, la muestra microbiana lisada con la proteína añadida será incubada a una temperatura y durante un tiempo suficientes para permitir trabajar a la proteasa. Estas condiciones son bien conocidas y fácilmente determinadas por una persona con conocimientos en la materia. Típicamente, la muestra microbiana lisada que contienen proteasa será incubada durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 60 minutos, a una temperatura apropiada para la proteasa utilizada.

15 En particular, cuando se usa proteinasa K, la muestra microbiana lisada será incubada a entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 65°C.

20 Después de la digestión de la proteasa, los ácidos nucleicos liberados pueden ser aislados, opcionalmente, usando cualquier técnica conveniente (véase, por ejemplo, las patentes US Nos. 5.234.809, 6.465.639, 6.673.631, 6.027.945, 6.383.393, 5.945.525, 6.582.922, entre otras). Una serie de kits/reactivos están disponibles comercialmente para realizar el aislamiento de ácidos nucleicos, por ejemplo, los kits MagAttract DNA o los kits EZ-1 DNA de Qiagen (Valencia CA, número de catálogo 953336) y los kits de aislamiento de ADN Mag de Agowa (Berlín, Alemania, número de catálogo 953034). Estos kits utilizan perlas magnéticas basadas en sílice y agentes caotrópicos para unir, de manera no específica, los ácidos nucleicos a las perlas. Puede usarse también cualquier procedimiento basado en membrana de sílice, tales como los kits QIAamp ADN (Qiagen, por ejemplo, números de catálogo 51304, 51161, 51192, 51104, 52904) y los kits Nucleospin (Machery-Nagel, por ejemplo, números de catálogo 740951, 740691, 740740, 740623,). Otros kits adecuados incluyen los kits MagneSil o 96 Wizard (Promega, número de catálogo A2250), el kit Nucleomag (Machery-Nagel, número de catálogo 744500), el kit DNA Direct (Dynal, número de catálogo 630.06) y Magnazorb (Cortex Biochem., números de catálogo MB1001, MB2001). Cuando se usan estos equipos. Se siguen los protocolos de los proveedores, excepto que las etapas y los reactivos para la lisis de la pared celular, si incluye alguno, son reemplazados por los procedimientos de lisis de la presente invención.

30

Los ácidos nucleicos aislados pueden ser detectados y/o analizados mediante cualquier técnica de detección convencional, incluyendo, por ejemplo, técnicas de amplificación, tales como PCR, TMA, NASBA, RT-PCR, seguido, opcionalmente, por un análisis de secuencia, si es conveniente, para la determinación de los tipos, especies y cepas de los microorganismos detectados. El objetivo de la amplificación y la detección puede ser uno que es similar entre una amplia variedad de especies microbianas (por ejemplo, el gen ARN 16S, gen 23S ARN, gen tuf (factor de elongación Tu) o cualquier gen de mantenimiento conservado para bacterias o levaduras) o puede ser uno que es específico para un organismo particular.

35

El procedimiento de lisis de la invención es realizado sobre una muestra que contiene o se sospecha que contiene células microbianas o microorganismos. Los términos "células microbianas" y "microorganismos" se usan de manera intercambiable, y se refieren a cualquier organismo unicelular, procariota o eucariota. Típicamente, las muestras usadas en el procedimiento de lisis contendrán los microorganismos en concentraciones muy bajas, por ejemplo, como un contaminante. La muestra puede contener otros tipos de células (por ejemplo, partículas, células individuales o partículas multicelulares de un organismo multicelular, por ejemplo, una muestra de sangre humana).

40

"Lisis" de una célula microbiana significa la ruptura, porción, permeabilización, digestión o descomposición de la pared celular microbiana, de manera que los componentes de ácido nucleico de la célula puedan ser liberados al medio externo. En algunas aplicaciones, la liberación de los ácidos nucleicos al medio externo puede ser facilitada por medio de la adición de un detergente que actúa para solubilizar las membranas celulares. Según la invención, la pared celular microbiana no tiene por qué ser disruptada, rota, permeabilizada o digerida completamente, con el fin de conseguir la liberación de los ácidos nucleicos.

45

"Liberación" de los ácidos nucleicos microbianos significa que los ácidos nucleicos microbianos, particularmente los ácidos nucleicos genómicos, ya no están retenidos en el interior de la célula, sino que están libres y accesibles para diversos procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos.

50

"Superficie inerte" significa cualquier número de superficie sólida en la que se sospecha puede haber ocurrido una contaminación microbiana. Dichas superficies pueden incluir, pero no se limitan a, una mesa de laboratorio, superficies que se encuentran en un entorno hospitalario, tales como paredes o mesas, o superficies o máquinas comunes en la industria de fabricación y preparación de alimentos.

55

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de la presente invención. No pretenden ser limitativos del alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1. Titulación de agente quelante para lisis microbiana

5 Para estos ejemplos, se usaron los microorganismos siguientes: *C. albicans*: ATCC 14053-U, *B. cereus*: ATCC 14579, *K. oxytoca*: ATCC 33496, *S. aureus*: ATCC 6538 y *S. agalactiae*: ATCC 12386. La detección basada en PCR de estos organismos se realizó usando los genes objetivo indicados, tal como se muestra: *C. albicans*: tuf (factor de elongación Tu), *B. cereus*: 16S rRNA, *K. oxytoca*: 23S rRNA, *S. aureus*: 23S rRNA y *S. agalactiae*: cfb (factor CAMP).

10 Para evaluar y optimizar el efecto del agente quelante EDTA, usado en combinación con liticasa y la lisozima en la composición de lisis de la muestra, se empleó el protocolo siguiente. *C. albicans* y *B. cereus*, de cultivos de crecimiento logarítmico, fueron añadidos a muestras de plaquetas de 2 ml (las plaquetas usadas fueron adquiridas de bancos de sangre, bien como plaquetas preparadas mediante aforesis o bien como muestras de plaquetas de donantes aleatorios) a 243 y 24 UFC/ml de *B. cereus*, y 155 y 16 UFC/ml de *C. albicans*. Los cálculos de UFC/ml fueron realizados según UFC/ml establecidas previamente a correlaciones OD600 nm. Las muestras fueron centrifugadas a 5.000 x g durante 10 minutos, y los pelets resultantes fueron resuspendidos en 150 µl de una solución que contenía EDTA. Para este estudio, las soluciones que contenían EDTA contenían de 0,2 a 0,5 M EDTA, pH 7,5, donde las soluciones EDTA variaban en incrementos de concentración de 0,05 M. La lisozima (10 µl a 400 mg/ml) (número de catálogo de Sigma L-7651) y la liticasa (10 µl a 1.000 unidades/ml) (número de catálogo de Sigma L-2425), recién preparadas, fueron añadidas y la mezcla fue incubada durante 60 minutos a 37°C, seguido por adición de proteinasa K (10 µl a 600 mAu/ml) (Qiagen, número de catálogo 19131) y una segunda incubación a 55°C durante 60 minutos. Después de la digestión enzimática, las muestras fueron procesadas usando los reactivos en el kit Qiagen MagAttract Mini DNA M48 (Qiagen, catálogo 953336), en combinación con un separador magnético Agowa (MaxiSep 7200, número de catálogo 4040). En pocas palabras, después de la digestión enzimática, las muestras fueron mezcladas con 720 µl de tampón de lisis Qiagen MTL del kit descrito anteriormente, y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, 30 µl de perlas de suspensión MagAttract del kit, suspendidas homogéneamente, fueron añadidas a cada muestra y se mezcló durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado usando el separador Agowa y fue desechado, mientras que las perlas fueron lavadas en el separador durante 2 minutos con 325 µl de tampón MW1 del kit Qiagen. Una segunda alícuota de 325 µl de tampón MW1 fue añadida a las perlas, y las perlas fueron lavadas durante 2 minutos adicionales. A continuación, las perlas fueron lavadas, de manera similar, dos veces con tampón MW2 del kit Qiagen y, finalmente, fueron enjuagadas con 650 µl de tampón de enjuague Qiagen o dH₂O. El ADN genómico ligado fue eluido de las perlas sometiendo las perlas a un ciclo en el separador Agowa en 100 µl de dH₂O, a 65°C, durante 2 minutos. Los eluidos (10 µl) fueron ensayados mediante PCR, usando un instrumento diseñado para valorar la producción de producto de PCR en tiempo real (por ejemplo, My iQ (BioRad)), usando incorporación de SYBR Green (Molecular Probes, Oregon). Todos los ensayos de PCR fueron realizados por duplicado y los resultados PCR positivos fueron verificados para formación correcta del producto, mediante un análisis de la curva de fusión. En este análisis, todas las reacciones PCR positivas para la formación de producto por un incremento de fluorescencia SYBR Green fueron sometidas a un análisis de temperatura de fusión, en el que las temperaturas de fusión (medidas como una pérdida de fluorescencia SYBR Green) en cada reacción, fueron observadas y comparadas con la temperatura de fusión característica conocida para cada objetivo específico. Los valores umbral de ciclo (Ct) (que se definen como el número de ciclos PCR necesarios para medir un incremento específico en la fluorescencia SYBR Green relativa a la referencia, lo que indica la formación de producto específico) de cada una de las repeticiones realizadas fueron promediados, y se muestran en la Tabla 1, a continuación. Estos experimentos indican que una concentración de EDTA preferente es de aproximadamente 0,3 y 0,5 M. Los experimentos de control, usando sólo los kits de aislamiento descritos anteriormente, y en los que las muestras microbianas no fueron tratadas con un agente quelante ni con enzimas líticas, eran mucho menos sensibles y sólo fueron capaces de detectar los microbios, a concentraciones de pico mucho más altas.

<i>C.albicans</i>	155 UFC/ml			16 UFC/ml		
Concentración EDTA	CT promedio	%CV	SD	CT promedio	%CV	SD
0,50 M	32,5	1,9	0,62	35,0	1,9	0,7
0,45 M	33,2	2,2	0,72	35,6	3,3	1,2
0,40 M	34,5	1,9	0,64	35,9	2,2	0,8

(Cont.)

0,35 M	34,6	3,7	1,31	36,4 ^b	2,9	1,1
0,30 M	36,6	2,6	0,95	38,0 ^a	4,0	1,5
0,25 M	37,0 ^a	N/A	N/A	N/A ^c	N/A	N/A
0,2 M	38,9 ^b	N/A	N/A	N/A ^c	N/A	N/A

Tabla 1 Concentraciones EDTA y *C. albicans* y *B. cereus*

<i>B. cereus</i>	243 UFC/ml			24 UFC/ml			
	Concentración EDTA	CT promedio	%CV	SD	CT promedio	%CV	SD
	0,50 M	25,3	2,8	0,71	28,1	1,38	0,39
	0,45 M	25,3	1,3	0,32	29,0	0,55	0,16
	0,40 M	26,0	0,5	0,13	28,4	1,99	0,56
	0,35 M	25,2	1,9	0,47	28,4	1,31	0,37
	0,30 M	25,4	1,3	0,33	28,1	1,18	0,33
	0,25 M	25,3	0,6	0,14	28,3	1,43	0,40
	0,2 M	25,5	0,05	0,01	29,0	0,62	0,18

a - 1 de cada 4 reacciones PCR produjo resultados positivos
b - 2 de cada 4 reacciones PCR produjo resultados positivos
c - no se obtuvieron resultados positivos de las 4 reacciones PCR

5 **Ejemplo 2 - Determinación de la temperatura de digestión enzimática**

[0040] Para evaluar las temperaturas de incubación preferentes para las enzimas líticas, se siguió el protocolo siguiente, en el que la temperatura usada durante la incubación con liticasa y liozima era de 30°C o 37°C durante 60 minutos. Esta incubación fue seguida de una incubación a 55°C, diseñada para la actividad de digestión óptima de proteinasa K. En pocas palabras, la fase log de *C. albicans* o *B. cereus* (100 UFC/ml) fueron añadidas a muestras de plaquetas de 3 ml. Las muestras fueron centrifugadas a 5.000 x g durante 10 minutos y los pelets fueron resuspendidos en 200 µl de 0,5 M EDTA, pH 7,5. Se añadieron liticasa (10 µl, 1000 U/ml), liozima (10 µl, 400 mg/ml) y proteinasa K (10 µl, 600 mAu/ml) a las muestras resuspendidas. A continuación, las muestras fueron incubadas durante 60 minutos a 30°C o 37°C, seguido de una incubación de proteinasa K a 55°C durante 60 minutos. Al término de las digestiones enzimáticas, las muestras fueron procesadas mediante PCR, tal como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 2 muestra los resultados de esta evaluación e indica que una temperatura de 37°C puede ser una temperatura de incubación preferente.

Tabla 2 – Temperaturas de incubación y *C. albicans* o *B. cereus*

Temperatura de incubación	<i>C. albicans</i>			<i>B. cereus</i>		
	CT promedio	%CV	SD	CT promedio	%CV	SD
30°C	30,2	3,8	1,1	27,3	1,9	0,5
37°C	29,1	5,2	1,5	26,5	1,5	0,4

Ejemplo 3 - Determinación del tiempo de incubación para la digestión enzimática

5 Para evaluar un tiempo de incubación mínimo para cada una de las dos digestiones enzimáticas: (1) 37°C para liticasa, lizozima y (2) 55°C para proteinasa K, que permitirá un procesamiento eficiente de las muestras, los tiempos de incubación a cada temperatura fueron variados entre 15 y 45 minutos. Los microorganismos en fase de crecimiento exponencial fueron añadidos a muestras de plaquetas de 3 ml, que fueron centrifugadas, a continuación, a 5.000 x g, durante 10 minutos. Los pelets resultantes fueron resuspendidos en 150 µl de 0,5 M EDTA, pH 7,5. Se añadieron liticasa (10 µl, 1000 U/ml), lizozima (10 µl, 400 mg/ml) y proteinasa K (20 µl, 600 mAu/ml) a las muestras resuspendidas, y las muestras fueron incubadas a 37°C, durante el período especificado. Después de la incubación a 37°C, las muestras fueron incubadas a 55°C, durante el tiempo especificado. A continuación, las muestras fueron procesadas tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, y 5 µl de muestras eluidas fueron evaluados mediante PCR. Los datos se presentan, a continuación, en la Tabla 3, e indican que un esquema de incubación preferente era de 37°C durante 30 minutos, seguido de 55°C durante 30 minutos. Para *C. albicans* a 10 UFC/ml, sólo los ensayos de incubación de 15 minutos a 37°C, 15 a 55°C proporcionaron resultados positivos de PCR.

Temp, tiempo de incubación		<i>B. cereus</i>				<i>K. oxytoca</i>			
		118 UFC/ml		11,8 UFC/ml		132 UFC/ml		13,2 UFC/ml	
37°C	55°C	CT	SD	CT	SD	CT	SD	CT	SD
15 min	15 min	30,6	0,8	33,8	1,4	26,4	1,0	29,5	0,1
15	30	28,9	0,4	32,8	1,6	26,0	0,3	29,2	0,5
30	15	28,3	0,5	31,7	1,5	25,9	0,5	28,1	0,7
30	30	26,0	0,6	31,1	0,9	26,0	0,5	28,9	0,4
30	45	25,7	0,5	31,7	1,1	26,0	0,4	28,8	0,2
20	20	28,2	0,2	31,6	1,0	26,0	0,4	28,5	0,1
30	60	28,1	1,1	31,6	0,4	26,0	0,5	28,8	0,1

Temp, tiempo de incubación		<i>S. aureus</i>				<i>S. agalactiae</i>			
		56 UFC/ml		5,6 UFC/ml		136,5 UFC/ml		13,7 UFC/ml	
37°C	55°C	CT	SD	CT	SD	CT	SD	CT	SD
15 min	15 min	31,9	0,4	36,0	2,1	28,8	0,3	32,8	0,8
15	30	20,7	0,6	32,6	0,7	27,9	0,4	30,9	0,6
30	15	30,6	0,4	36,1	1,5	27,7	0,8	29,9	1,2
30	30	29,0	1,0	32,3	3,8	27,3	0,2	32,0	0,6
30	45	29,9	0,3	36,3	1,6	27,3	0,3	30,8	0,6
20	20	30,2	0,5	32,5	2,3	27,3	0,2	30,8	0,6
30	60	32,6	1,1	32,6	1,3	28,0	0,3	30,1	0,1

Tabla 3 – Tiempos de incubación y *B. cereus*, *K. Oxytoca*, *S. aureus*, *S. agalactiae* o *C. albicans*

Temp, tiempo de incubación		<i>C. albicans</i>			
		100 UFC/ml		10 UFC/ml	
37°C	55°C	CT	SD	CT	SD
15 min	15 min	37,4	2,4	37,2	0,6
15	30	33,5	1,4	ND	ND
30	15	36,1	1,4	ND	ND
30	30	33,1	1,5	ND	ND
30	45	32,1	1,1	ND	ND
20	20	34,3	0,5	ND	ND
30	60	33,5	0,6	ND	ND

5 Ejemplo 4 - Evaluación de la metodología en una diversidad de muestras

Una diversidad de matrices de muestras fueron evaluadas en el procedimiento de la invención, En cada caso, los microorganismos fueron añadidos a los diversos tipos de muestras y, a continuación, el protocolo continuó para determinar si los microorganismos añadidos podían ser detectados. En el primer conjunto de datos, se evaluaron muestras de sangre entera, plasma y orina, y en el segundo conjunto, se añadieron los microorganismos de ensayo a las muestras de frotis de piel, boca y mesa del laboratorio y las mismas fueron procesadas.

Para la evaluación del protocolo en sangre entera, plasma y orina, el protocolo se siguió el protocolo siguiente: se añadieron microorganismos de ensayo a volúmenes de muestras de 3 ml de plasma y de orina, mientras que con las

ES 2 371 764 T3

muestras de sangre entera, se usaron volúmenes de 0,1 ml. Las muestras fueron centrifugadas y resuspendidas según se ha descrito en el Ejemplo 1, con la excepción de que la muestra de sangre entera no fue centrifugada. Las muestras fueron procesadas tal como se ha descrito, usando 30 minutos a 37°C y 30 minutos a 55°C, para los tiempos de incubación de enzimas. Muestras de eluato de 5 µl fueron sometidas a PCR tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, y los datos se presentan a continuación en la Tabla 4.

5

B. cereus					
Muestra	UFC/ml	CT	SD	%CV	PCR+
0,1 ml de sangre	40	35,22	ND	ND	2/6
	80	34,54	ND	ND	5/6
	240	32,92	1,68	5,12	6/6
	15	31,52	0,97	3,06	6/6
3 ml de plasma	8	32,37	ND	ND	5/6
	24	31,49	0,99	3,14	6/6
	80	29,58	0,94	3,18	6/6
	240	26,12	0,13	0,52	6/6
3 ml de orina	8	34,63	ND	ND	2/6
	24	33,73	ND	ND	3/6
	80	33,07	1,17	3,54	6/6
	240	30,89	1,49	4,82	6/6

K. oxytoca					
Muestra	UFC/ml	CT	SD	%CV	PCR+
0,1 ml de sangre	76	33,78	2,06	6,10	6/6
	153	31,35	1,21	3,86	6/6
	458	30,14	0,74	2,45	6/6
	1.525	28,49	0,64	2,25	6/6
3 ml de plasma	15	29,65	ND	ND	5/6
	46	28,07	0,43	1,54	6/6
	153	26,31	0,58	2,21	6/6
	458	24,18	0,33	1,36	6/6

ES 2 371 764 T3

(Cont.)

3 ml de orina	15	30,02	0,56	1,88	6/6
	46	28,55	ND	ND	5/6
	153	26,90	0,30	1,10	6/6
	458	25,83	ND	ND	5/6

S. aureus					
Muestra	UFC/ml	CT	SD	%CV	PCR+
0,1 ml de sangre	11	34,42	ND	ND	5/6
	22	33,50	ND	ND	5/6
	68	33,26	ND	ND	5/6
	225	32,93	1,89	5,75	6/6
3 ml de plasma	2	34,86	ND	ND	3/6
	7	34,12	1,93	5,66	5/6
	23	32,73	0,97	2,96	6/6
	68	30,29	0,76	2,51	6/6
3 ml de orina	2	35,79	ND	ND	5/6
	7	35,86	ND	ND	3/6
	23	33,78	1,42	4,20	5/6
	68	32,85	1,01	3,09	6/6

S. agalactiae					
Muestra	UFC/ml	CT	SD	%CV	PCR+
0,1 ml de sangre	39	36,98	ND	ND	4/6
	78	32,88	1,28	3,88	6/6
	234	31,52	1,16	3,69	6/6
	780	30,37	1,01	3,33	6/6

(Cont.)

3 ml de plasma	7,8	31,59	0,85	2,68	6/6
	23,4	30,90	0,24	0,77	6/6
	78	28,50	0,72	2,53	6/6
	234	26,36	0,82	3,12	6/6
3 ml de orina	7,8	32,35	0,95	2,94	6/6
	23,4	31,71	ND	ND	5/6
	78	29,38	1,04	3,55	6/6
	234	28,05	0,75	2,68	6/6

Tabla 4 – Detección de microorganismos en sangre entera, plasma o orina

C. albicans					
Muestra	UFC/ml	CT	SD	%CV	PCR+
0,1 ml de sangre	30,5	ND	ND	ND	0/6
	61	29,81	ND	ND	4/6
	183	26,18	4,82	18,42	6/6
	610	32,50	ND	ND	4/6
3 ml de plasma	6,1	28,43	ND	ND	4/6
	18,3	30,89	3,02	9,78	6/6
	61	28,70	4,00	13,94	6/6
3 ml de orina	6,1	25,73	5,72	22,24	6/6
	18,3	23,21	ND	ND	2/6
	61	27,35	ND	ND	4/6

- 5 Para evaluar el protocolo para la detección de microorganismos en muestras de frotis, los microorganismos de ensayo fueron añadidos a las muestras de frotis recogidas de la piel, boca o una mesa de laboratorio. Para estos experimentos, se usaron dos tipos de medios de frotis comunes: medio Amies (3,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,1 g de CaCl, 0,1 g de MgCl, 0,2 g de fosfato de monopotasio, 1,15 g de fosfato de disodio, 1,0 g de tioglicolato de sodio por litro) (LQ Amies Swabs de Health Link, número de catálogo 4140 BX) o medio Stuart (10,0 g de glicerofosfato de sodio, 0,1 g de CaCl, 1,0 ml de ácido mercaptoacético por litro) (CultureSwab™ Liquid Stuart BD Diagnostics, número de catálogo 220109). Se colocaron 0.1 ml de medio de frotis en tubos de frotis, y las muestras de frotis fueron tomadas frotando superficies de la piel, boca o mesa de laboratorio, con los hisopos. Las muestras fueron incubadas en los tubos de frotis originales durante al menos 5 minutos. A continuación, las muestras fueron preparadas transfiriendo los
- 10

frotis a tubos que contenían 0,2 ml de PBS a los que se añadieron los microorganismos de ensayo. Todos los frotis fueron tomados por duplicado y fueron procesados según el protocolo descrito en el Ejemplo 1, siendo las condiciones de incubación las descritas en el Ejemplo 3. Se usaron muestras de eluatos de 5 µl para un análisis de PCR, y los datos se presentan en la Tabla 5, a continuación. Los resultados indican que el procedimiento puede ser capaz de detectar los microorganismos en muestras de frotis.

5

B. cereus						
Muestra	Fuente de frotis	UFC/ml	CT	SD	%CV	PCR+
Medio Stuart	Boca	1070	27,43	0,45	1,64	4/4
	Piel	1070	27,55	0,49	1,77	4/4
	Prueba	1070	27,19	0,26	0,94	4/4
Medio Amies	Boca	1070	27,77	0,32	1,16	4/4
	Piel	1070	27,04	0,57	2,13	4/4

B. cereus						
Muestra	Fuente de frotis	UFC/ml	CT	SD	%CV	PCR+
Medio Stuart	Boca	530	31,39	0,34	1,08	4/4
	Piel	530	31,16	0,32	1,04	4/4
	Prueba	530	31,52	0,56	1,78	4/4
Medio Amies	Boca	530	31,07	0,55	1,78	4/4
	Piel	530	31,39	0,46	1,45	4/4

Tabla 5 – Detección de microorganismos añadidos a muestras de frotis

B. cereus						
Muestra	Fuente de frotis	UFC/ml	CT	SD	%CV	PCR+
Medio Stuart	Boca	1.365	28,87	0,74	2,55	4/4
	Piel	1.365	28,88	1,01	3,50	4/4
	Prueba	1.365	29,36	0,71	2,42	4/4
Medio Amies	Boca	1.365	29,59	0,46	1,56	4/4
	Piel	1.365	29,74	0,40	1,35	4/4

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de ruptura de células microbianas para permitir la liberación de ácido nucleico desde las células microbianas presentes en una muestra, que comprende:
- 5 proporcionar una muestra que contiene o se sospecha que contiene células microbianas, en la que la muestra es una muestra líquida o suspensión,
- producir una composición de lisis de la muestra (1) añadiendo un agente quelante a la muestra hasta una concentración final de entre 0,3 M, y 0,5 M, (2) añadiendo a la muestra una mezcla de enzimas de lisis,
- e incubar la muestra durante un tiempo y a una temperatura suficientes para producir una muestra de células microbianas lisadas y permitir, de esta manera, la liberación de los ácidos nucleicos microbianos.
- 10 2. Procedimiento de ruptura de células microbianas según la reivindicación 1, en el que dicho agente quelante es seleccionado de entre el grupo que consiste en EDTA y EGTA y sus sales.
- 3 Procedimiento de ruptura de células microbianas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha mezcla de enzimas de lisis consiste, esencialmente, en al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en lisozima, lisostafina y mutanolisina, y al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en
- 15 liticosa y zimolasa.
4. Procedimiento de ruptura de células microbianas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha mezcla de enzimas de lisis consiste esencialmente en al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en lisozima, liostafina y mutanolisina, y al menos una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en liticosa y zimolasa.
- 20 5. Procedimiento de ruptura de células microbianas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha incubación es de entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 37°C, durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos.
6. Procedimiento de ruptura de células microbianas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente quelante y dicha mezcla de enzimas de lisis son añadidos a la muestra, al mismo tiempo.
- 25 7. Procedimiento de ruptura de células microbianas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente quelante es EDTA.
8. Procedimiento de ruptura de células microbianas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la preparación de una muestra microbiana lisada, que contiene proteasa, añadiendo una proteasa a dicha muestra líquida o suspensión.
- 30 9. Procedimiento de ruptura de células microbianas según la reivindicación 8, que comprende además:
- incubar dicha muestra microbiana lisada, que contiene proteasa, a una temperatura de entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 65°C.
10. Procedimiento de ruptura de células microbianas según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que dicha proteasa es añadida a dicha muestra de células microbianas lisadas.
- 35 11. Procedimiento de ruptura de células microbianas según la reivindicación 8, 9 o 10, en el que la proteasa es añadida a dicha muestra líquida o suspensión al mismo tiempo que dicha mezcla de enzimas de lisis.
12. Procedimiento de ruptura de células microbianas según las reivindicaciones 8, 9, 10 o 12, en la que dicha proteasa es proteinasa K.
- 40 13. Procedimiento de ruptura de células microbianas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende la etapa adicional de aislar dichos ácidos nucleicos microbianos liberados.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicha etapa de aislamiento comprende añadir un agente caotrópico, un detergente y un soporte de unión de ácidos nucleicos a dicha muestra de células microbianas lisadas, bajo condiciones que permiten la unión de dichos ácidos nucleicos a dicho soporte de unión de ácidos nucleicos.
- 45 15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que dicha muestra es seleccionada de entre el grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de concentrado de hematíes, una muestra de plaquetas, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de saliva, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de líquido intersticial, una muestra de biopsia tisular, una muestra de lavado,

ES 2 371 764 T3

una muestra de esputo y un muestra de frotis vaginal, dental, rectal, uterino o de una superficie inerte.