

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 171**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2009 E 09748868 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2245179**

54 Título: **Método y medio para detectar la presencia o ausencia de Staphylococcus aureus en una muestra de ensayo**

30 Prioridad:

24.01.2008 US 62144 P
27.10.2008 US 108722 P
21.01.2009 US 356847

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2013

73 Titular/es:

PILOTS POINT LLC (100.0%)
Building 174 242 S. Washington Boulevard
Sarasota, FL 34236, US

72 Inventor/es:

EDBERG, STEPHEN C.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 431 171 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

Método y medio para detectar la presencia o ausencia de *Staphylococcus aureus* en una muestra de ensayo

5 **Antecedentes de la invención**

1. Información técnica

10 El presente método y mezcla de ensayo se refiere a la detección de *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilina en una muestra biológica, ambiental o de alimento y más particularmente a aquellos métodos y mezclas de ensayo que utilizan factores de reacción que el microbio o los microbios diana pueden convertir en un coágulo.

2. Información de antecedentes

15 El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) puede ser un agente patógeno virulento de animales y seres humanos. Además, el mismo puede provocar intoxicación alimentaria grave mediante la producción de una toxina. Las enfermedades causadas por *S. aureus* abarcan un espectro clínico muy amplio, desde infecciones dérmicas sencillas hasta infecciones con peligro para la vida de los huesos, corazón y órganos. El reconocimiento de que
20 infección por *S. aureus* es común después de cirugía es de preocupación particular. El mismo también se asocia con tubos intravenosos y otros implantes.

La bacteria *S. aureus* se puede transmitir entre individuos sanos mediante contacto de piel a piel o desde un artículo o una superficie compartida de forma común (por ejemplo, camas de bronceado, equipo de gimnasio, equipo de manipulación de alimentos, etc.) donde la transferencia se puede realizar a una persona posterior que usa el artículo compartido o toca la superficie. El reconocimiento de que personas sanas que entran en hospitales pueden “portar”
25 *S. aureus* (por ejemplo, en su piel, o en sus narices, etc.) sin ningún signo o síntoma de que los mismos lo portan es de gran preocupación médica. En presencia de condiciones favorables (encontradas con frecuencia, aunque sin limitación, en hospitales), el *S. aureus* puede activar y provocar infección grave. Además, *S. aureus* también puede ser una fuente de intoxicación alimentaria, causada con frecuencia por un manipulador de alimentos que contamina el producto alimenticio (por ejemplo, carne, pollo, huevos, ensaladas que contienen mayonesa, productos de panadería, productos lácteos, etc.).
30

Existen dos categorías de *S. aureus* en base a la sensibilidad de un clon individual frente a la clase de antibióticos que se inició con la metilina. Estos son *S. aureus* sensibles a metilina (MSSA) y *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA). Hasta hace unos pocos años, MRSA se encontraba más comúnmente en hospitales. Actualmente, muchos también están presentes en la nariz, piel, etc. de personas en la comunidad no hospitalaria. Adicionalmente, estos MRSA están provocando de forma creciente infecciones graves en la comunidad. MRSA es particularmente grave debido a que pocos antibióticos (por ejemplo, vancomicina) han demostrado ser eficaces de forma uniforme frente a MRSA.
35

40 El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades estudia activamente el desarrollo de *S. aureus* resistente a metilina. En el año 2000, las directrices de la Sociedad Estadounidense de Epidemiología Hospitalaria recomendaban el aislamiento de contacto para pacientes con MRSA. Adicionalmente a la morbilidad y mortalidad provocada por MRSA, se ha estimado que cada caso de infección cuesta al menos \$23.000. Por consiguiente, muchos hospitales y hogares de ancianos toman muestras de manera proactiva de los pacientes para MRSA [Clany, M., Active Screening in High-Risk units is an effective and cost-avoidant method to reduce the rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in the hospital., *Infection Control and Hospital Epidemiology* 27: 1009-1017, 2006].
45

50 Meyer *et al.* (Patente de Estados Unidos N° 4.035.238) describen el uso de un caldo para la detección de *S. aureus* que utilizaba manitol como una fuente de carbono y verde de metilo de ADN como un indicador. Ninguno de estos agentes químicos son sustratos reactivos a coagulasa.

Rambach (Patente de Estados Unidos N° 6.548.268) emplea al menos dos agentes cromógenos en un medio de agar: 5-bromo-6-cloro-indoxil-fosfato; y 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucosa en presencia de deferoxamina. Una colonia individual que hidroliza estos sustratos producirá colores que se mezclarán entre sí y que no serán independientes los unos de los otros.
55

Se utiliza un gran número de procedimientos de cultivo clásico para detectar MSSA y MRSA a partir de muestras humanas, animales, alimentos, etc. Los mismos tienen en común un medio básico con inhibidores químicos tal como cloruro de sodio al 6-8%, telurito de potasio y una diversidad de antibióticos. Por ejemplo Stevens y Jones describieron el uso de un agar de trehalosa-manitol-fosfatasa [Stevens, DL y Jones, C. Use of trehalose-mannitol-phosphatase agar to differentiate *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* from other coagulase-negative staphylococci, *J. of Clin. Micro-biology* 20: 977-980, 1984]. El uso de manitol como una fuente de carbono y sal como un agente selectivo en un agar conocido como agar manitol sal se ha usado comúnmente en laboratorios clínicos [Baird, R. M. y W. H. Lee., Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus*
60
65

aureus., Int. J. Food Microbiology. 26: 209-211, 1995]. Dentro de la técnica anterior de cultivo, es un procedimiento generalmente aceptado llevar a cabo ensayos de coagulasa que utilizan muestras de *S. aureus* que se aíslan en un cultivo puro.

- 5 El procedimiento "ID de *S. aureus*" [Bio Merieux, La Balme Les Grottes, Francia] usa un sustrato de alfa glucosidasa en agar para detectar *S. aureus*. Se utiliza un sustrato único. [Perry, J. D. *et al.*, Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiology 41: 5695-5698, 2003]. Una variante de este medio, que contiene antibióticos y cloruro de sodio añadidos, se diseña para detectar MRSA [Perry *et al.*, Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J. of Clin. Micro. 42: 4519-4523, 2004].

Selepak y Witebsky divulgan un estudio que evalúa el tamaño de inóculo y la variabilidad de lote a lote del ensayo de coagulasa en tubo para *S. aureus*. Las muestras de ensayo se recogieron y se generaron aislados a partir de colonias bacterianas en placas de agar. Tubos que contenían plasma de coagulasa de conejo anticoagulado se inocularon con una parte de, o más de una, colonia estafilocócica a partir de los aislados. Los tubos se incubaron y se examinaron para determinar la presencia de coágulo. De acuerdo con Selepak y Witebsky, "con algunos aislados y algunos lotes de plasma de coagulasa, incluso una colonia única [a partir del aislado] puede no proporcionar inóculo suficiente para un ensayo de coagulasa positivo". Además, Selepak y Witebsky indican que "[e]xpresado de forma más cuantitativa, al menos 10^8 organismos por ml se deberían usar siempre que sea posible para cada ensayo de tubo de coagulasa. Nuestros datos sugieren además que *S. aureus* no crece en plasma de coagulasa; por lo tanto, la incubación de plasma de coagulasa durante 18 a 24 h no compensa el uso de inóculo pequeño". Por tanto, Selepak y Witebsky indican que es poco práctico, si no imposible, detectar la presencia o ausencia de *S. aureus* en muestras de ensayo biológicas de primera generación usando un ensayo de coagulasa directo. [Selepak, S. T *et al.*, "Inoculum Size and Lot-to-Lot Variation as Significant Variables in the Tube Coagulase Test for *Staphylococcus aureus*", Journal of Clin. Microbiology, Nov. 1985, pág. 835-837].

Yazdankhah (Yazdankhah S P *et al.*: "Simple and direct detection of *Staphylococcus aureus* in milk by a tube coagulase test.", Letters in Applied Microbiology, 1998, vol. 27, N° 2, Agosto 1998 (1998-08), páginas 111-115) describe un ensayo de coagulasa en tubo (TCT) como un sistema sencillo y no costoso para la detección de *Staphylococcus aureus* directamente en leche. El procedimiento se caracteriza por la mezcla de muestras de leche con plasma de citrato de conejo seguido por incubación a 37 °C para formación de coágulo. El ensayo de coagulasa en tubo demostró una precisión del 91,5%, una sensibilidad del 88,5% y una especificidad del 100% para el reconocimiento directo de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche a partir de cuartos con mastitis subclínica, en comparación con la siembra en placas de leche en agar sangre.

Lominski (Lominski I *et al.* "An improved direct coagulase test for the rapid detection of *Staphylococcus aureus*.", British medical journal 1948, vol. 116, N° 4546, 1948, página 343) sugiere un método para la detección rápida de *Staphylococcus aureus* que consiste en añadir el material que se tiene que investigar directamente a una mezcla que contiene plasma citratado, caldo de extracto de carne y heparina. La coagulación de plasma indica la presencia de *Staphylococcus aureus*. De acuerdo con Lominski, se desarrollaron reacciones positivas a 37 °C dentro de varias horas.

Carey (Carey B E *et al.*: "The combined oxacillin resistance and coagulase (CORC) test for rapid identification and prediction of oxacillin resistance in *Staphylococcus* species directly from blood culture.", Journal of clinical pathology, BMJ Publishing Group, GB, vol. 61, N° 7, 1 Julio 2008 (2007-07-01), páginas 866-868) describe un protocolo combinado de resistencia a oxacilina y coagulasa para identificación y determinación rápida de sensibilidad a oxacilina en *Staphylococcus* spp a partir de cultivo se sangre. El método requiere que la sangre se someta en primer lugar a procesamiento que separe los elementos celulares del suero. El suero sanguíneo se transfiere posteriormente a un caldo de medio de cultivo general donde se añade oxacilina. Después de incubación, se realizan ensayos de coagulasa y sensibilidad a antibiótico separados de forma independiente.

Bottone (Bottone *et al.*: "Rapid detection and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive blood cultures exhibiting gram-positive cocci in clusters.", Clinical microbiology newsletter, Elsevier, New York, NY, US, vol. 29, N° 18, 31 Agosto 2007 (2007-08-31), páginas 137-139) llevó a cabo ensayos directos para coagulasa y PBP2a a partir de alícuotas centrifugadas de sangre de botellas de cultivo sanguíneo BACTEC que muestran cocos gram positivos en grupos, que se parecen morfológicamente a estafilococos. Al mismo tiempo, se llevaron a cabo ensayos de sensibilidad directos para resistencia a cefoxitina y clindamicina. MRSA es positivo a coagulasa, positivo a PBP2a y resistente a cefoxitina, mientras que MSSA es positivo a coagulasa, negativo a PBP2a y sensible a cefoxitina.

Smyth (Smyth R W *et al.*: "Mannitol salt agar-cefoxitin combination as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.", Journal of clinical microbiology, vol. 43, N° 8, Agosto 2005 (2005-08), páginas 3797-3799) observó que la cefoxitina era un indicador mejor que la oxacilina para determinar la presencia del gen *MecA* en *Staphylococcus aureus*. Smyth describe el desarrollo y ensayo posterior de agar manitol sal que contiene cefoxitina con una colección de cepas de MRSA bien caracterizadas y un número igual de cepas de *S. aureus* negativas para *MecA*. El agar soportó el crecimiento de la mayoría de las cepas positivas a *MecA* e inhibió el crecimiento del 100% de las cepas negativas a *MecA*.

Por lo tanto, sería deseable proporcionar una mezcla de ensayo y un método que puedan detectar rápidamente *S. aureus* Resistente a Metilicina directamente a partir de una muestra, uno que no requiera que un técnico experto realice el método, uno que se pueda realizar sin la necesidad de desarrollar aislados a partir de la muestra de

ensayo (es decir, uno que se pueda realizar en una muestra de “primera generación”) y uno que no requiera que una gran concentración de organismos *S. aureus* resistente a meticilina sea precisa.

Sumario de la invención

5 La materia objeto de la presente invención es un método para detectar la presencia o ausencia de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (“MRSA”) en una muestra de ensayo de primera generación, donde la muestra de ensayo de primera generación es una muestra de ensayo no tratada recogida directamente a partir de una muestra de ensayo biológica, ambiental o de alimento, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 a) proporcionar una mezcla de ensayo que incluye constituyentes promotores del crecimiento que faciliten la multiplicación de *Staphylococcus aureus* (“*S. aureus*”), sustratos de coagulasa operativos para reaccionar con coagulasa producida por *S. aureus* para crear un coágulo, donde se incluyen plasma y fibrinógeno como una fuente de sustratos de coagulasa y una cantidad de un inductor de gen *MecA* eficaz para destruir cualquier *Staphylococcus Aureus* Sensible a Meticilina (“MSSA”) en la muestra de ensayo de primera generación;
- 15 b) inocular la mezcla de ensayo con la muestra de ensayo de primera generación;
- c) incubar la mezcla de ensayo inoculada a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 42 °C, y
- 20 d) observar la mezcla de ensayo inoculada para advertir la presencia o ausencia de un coágulo dentro de la mezcla inoculada.

La materia objeto de la presente invención también se refiere a una mezcla de ensayo para su uso en la detección de la presencia o ausencia de *Staphylococcus Aureus* Resistente a Meticilina (“MRSA”) en una muestra de ensayo de primera generación, donde una muestra de ensayo de primera generación es una muestra de ensayo no tratada recogida directamente a partir de una muestra de ensayo biológica, ambiental o de alimento, comprendiendo la mezcla de ensayo:

- 25 a) una cantidad eficaz de aminoácidos;
- b) una cantidad eficaz de fuentes de nitrógeno;
- 30 c) una cantidad eficaz de sales;
- d) una cantidad eficaz de vitaminas;
- e) una cantidad eficaz de calcio;
- f) una cantidad eficaz de sustratos de coagulasa operativos para producir un coágulo dentro de la mezcla de ensayo en presencia de *S. aureus* en la muestra de ensayo de primera generación y donde se incluyen plasma y fibrinógeno como una fuente de sustrato de coagulasa;
- 35 g) una cantidad de un inductor de gen *MecA* eficaz para destruir cualquier *Staphylococcus Aureus* Sensible a Meticilina (“MSSA”) en la muestra de ensayo de primera generación.

40 La presente invención se refiere a un método y mezcla de ensayo para la detección específica de bacterias MRSA en una muestra biológica, ambiental o de alimento. En la detección de MRSA, se utiliza una mezcla de ensayo (mezcla que también se puede denominar “medio”) que incluye sustratos de coagulasa (denominados algunas veces “factores reactivos a coagulasa”) que reaccionan específicamente con la coagulasa producida por *S. aureus* para formar un coágulo, mezclados con constituyentes que facilitan la multiplicación de *S. aureus* (también denominados “constituyentes promotores del crecimiento”). Por lo tanto, el presente método y muestra de ensayo utilizan sustratos de coagulasa que se activan por la coagulasa producida por *S. aureus* y la enzima coagulasa es específica de estafilococos patógenos, como se divulga en el Código del Registro Federal, Título 21, Capítulo 1, Subparte C, Sección 866.2160 “Coagulase Plasma”. Se pueden incluir inhibidores y antibióticos para inhibir o influir de otra manera negativamente sobre el crecimiento de bacterias competidoras diferentes a MSSA, pero no son necesarios. La muestra no tratada (por ejemplo, recogida a partir de un hisopo nasal a partir de una persona o de una superficie etc.) se añade a la mezcla de ensayo y la muestra de ensayo inoculada se incuba. Si MRSA está presente dentro de la muestra, MRSA se multiplicará dentro de la mezcla de ensayo y producirá coagulasa que reacciona con los sustratos de coagulasa. La reacción entre la coagulasa producida por la MRSA y los sustratos de coagulasa dentro de la mezcla de ensayo producirá un coágulo detectable dentro de la mezcla de ensayo en un periodo de tiempo típicamente entre dos y veinticuatro horas, indicando positivamente la presencia de MRSA.

55 En el presente método, el coágulo se puede disolver para liberar MRSA viables en un líquido, líquido que se puede someter posteriormente a análisis adicionales, incluyendo pero sin limitación: ensayo de sensibilidad a antibiótico, huellas moleculares, análisis genéticos, etc. Como se describirá más adelante con mayor detalle, el antibiótico cefoxitina o un inductor del gen *mecA* se incluyen dentro de la mezcla de ensayo para permitir el ensayo específico de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) dentro de la muestra de primera generación.

60 La mezcla de ensayo se prepara preferentemente en una forma que facilite el manejo, envasado, almacenamiento, etc., de la mezcla de ensayo. Un polvo seco que se puede hidratar en forma líquida es una forma particularmente preferible para la mezcla de ensayo, pero la presente invención no se limita a una forma en polvo. La mezcla de ensayo puede asumir una forma líquida o cualquier otra forma (por ejemplo, pasta, gel, etc.), preferentemente una que se pueda hidratar para su uso.

Los sustratos de coagulasa dentro de la mezcla de ensayo se proporcionan dentro de plasma e incluyen además fibrinógeno. Los sustratos de coagulasa son operativos para reaccionar con la coagulasa producida por *S. aureus* para formar un coágulo. Los ensayos actuales indican que el plasma de conejo es una fuente favorable de un sustrato de coagulasa. Otros plasmas (por ejemplo, plasma de cerdo) se pueden usar como alternativa. El fibrinógeno es otro ejemplo de una fuente de sustrato de coagulasa. La presente invención utiliza plasma como una fuente de un sustrato de coagulasa y añade una fuente no plasmática de un sustrato de coagulasa a la mezcla de ensayo, es decir, fibrinógeno, para asegurar una fuente adecuada de sustrato de coagulasa dentro de la mezcla de ensayo. Como un ejemplo, nuestros ensayos indican que la combinación de fibrinógeno y plasma de conejo dentro de la mezcla de ensayo es un medio eficaz para asegurar una fuente consistente y adecuada de sustratos de coagulasa. Una ventaja de añadir fibrinógeno a la mezcla de ensayo es que aumenta la consistencia del rendimiento de la mezcla de ensayo y hace que el método sea menos sensible a variabilidad que puede presentarse con el plasma.

Los constituyentes promotores del crecimiento dentro de la mezcla de ensayo que facilitan la multiplicación y soportan *S. aureus* se pueden variar para adecuarse a la aplicación. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden usar muchas combinaciones diferentes de constituyentes y cantidades relativas variables de los mismos constituyentes, para proporcionar la misma funcionalidad. Los constituyentes promotores del crecimiento incluyen fuentes de nitratos y proteínas, material operativo para ayudar a la generación de síntesis de ácido nucleico, fuentes de energía para el *S. aureus*, fuentes de factor de crecimiento de aminoácidos y en algunas realizaciones materiales que funcionan para reparar organismos diana dañados. La lista de constituyentes promotores del crecimiento no representa todos los materiales que pueden ser beneficiosos dentro de la mezcla de ensayo, sino que ilustra materiales que son aceptables (por ejemplo, vitaminas, sales, minerales, restos inorgánicos, etc.). La mezcla de ensayo puede incluir otros constituyentes que benefician al rendimiento de la mezcla de ensayo.

En el método de la presente invención, será deseable utilizar una mezcla de ensayo que incluya lo siguiente: a) una cantidad eficaz de aminoácidos; b) una cantidad eficaz de fuentes de nitrógeno; c) una cantidad eficaz de sales; d) una cantidad eficaz de vitaminas; y e) una cantidad eficaz de calcio. Los expertos en la técnica reconocerán que fuentes naturales de tales aminoácidos se pueden usar en lugar de fuentes puras. Las fuentes naturales (por ejemplo extracto de organismos completos, tales como levadura) pueden estar en forma de mezcla o en forma purificada. Las mezclas naturales pueden contener cantidades variables de tales aminoácidos y vitaminas. Los expertos en la técnica reconocerán además que se pueden usar muchas combinaciones diferentes de aminoácidos y vitaminas en la mezcla de ensayo de la presente invención.

Los expertos en la técnica reconocerán además que se puede proporcionar carbono, nitrógeno, elementos trazas, vitaminas, aminoácidos y agentes selectivos de muchas formas. En general, se prefiere tener una cantidad de vitaminas y aminoácidos dentro de un intervalo predeterminado, pero los expertos en la técnica reconocerán que las propiedades reales de cada ingrediente pueden variar de forma que la reducción en la cantidad de un ingrediente se puede compensar mediante un aumento en la cantidad de otro. Esto es particularmente pertinente cuando se conocen los aminoácidos esenciales, elementos trazas o vitaminas de los microbios que se desea detectar. Se pueden proporcionar algunos ingredientes en cantidades reducidas o suprimidos si los mismos se pueden sintetizar endógenamente por el microorganismo cuya presencia se tiene que determinar. Se pueden proporcionar sales como una fuente de iones tras la disociación.

La mezcla de ensayo se puede envasar en un recipiente (por ejemplo, un tubo de ensayo, un recipiente con una pared de fondo plano, etc.) que facilite el proceso de ensayo. Si el medio se prepara en una forma que se puede hidratar, la mezcla se puede hidratar con agua estéril o con agua no estéril.

Para detectar la presencia de MRSA dentro de una muestra, la muestra se obtiene a partir de una muestra de ensayo biológica, ambiental o de alimento. Una muestra recogida usando un hisopo nasal es un ejemplo de una muestra de primera generación que es particularmente conveniente de recoger y ensayar usando la presente invención. Una vez recogida, la muestra se inocula dentro de la mezcla de ensayo.

La muestra inoculada se incuba en condiciones favorables para facilitar la multiplicación de cualquier *S. aureus* que pueda estar presente dentro de la muestra inoculada, sin embargo, debido a la presencia de un inductor de gen MecA únicamente crece MRSA. En el caso de una mezcla de ensayo en polvo hidratada con agua, la incubación se puede llevar a cabo a temperaturas entre aproximadamente 20 °C y 42 °C. La combinación de especificidad de enzima secuencial, factores del crecimiento potenciadores de *S. aureus* y selectividad de antibiótico proporciona múltiples obstáculos que evitan que bacterias no diana competidoras se detecten dentro del periodo de ensayo; por ejemplo 24 horas o menos.

El ensayo y método de la presente invención se puede usar en las admisiones de hospitales, de forma rutinaria en unidades de cuidado intensivo, en hogares para ancianos, pacientes de diálisis, personas que reciben terapia inmunosupresora a domicilio y similares. También se puede usar en entornos ambientales (por ejemplo, gimnasios, salones de bronceado, restaurantes, etc.) donde las bacterias MRSA se pueden transferir desde un portador humano y se puede usar para ensayar diversos alimentos diferentes para determinar contaminación por MRSA. Se apreciará que un beneficio sustancial del presente método y mezcla es que los mismos se pueden llevar a cabo/usar

sin la necesidad de equipo costoso o técnicos médicos expertos. Otro beneficio sustancial del presente método/mezcla es que puede funcionar con una cantidad relativamente pequeña de MRSA dentro de la muestra de ensayo; por ejemplo, el presente método/mezcla ha detectado *S. aureus* en muestras que tienen concentraciones de *S. aureus* tan bajas como 100 UFC/ml.

5 **Breve descripción de los dibujos**

10 Los detalles de la invención se harán más fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones de la invención y realizaciones de referencia cuando se toman junto con los dibujos adjuntos en los cuales:

15 La FIGURA 1 es una vista en alzado lateral de un tubo de ensayo que contiene una mezcla de cultivo en polvo que se formula para detectar la presencia o ausencia de *S. aureus* en una muestra biológica de primera generación de un hisopo nasal;

La FIGURA 2 es una vista en alzado lateral del tubo de ensayo de la FIGURA 1, pero que muestra la mezcla de cultivo habiendo sido hidratada por agua,

20 La FIGURA 3 es una vista en alzado lateral del tubo de ensayo de la FIGURA 2 y que muestra un hisopo de algodón insertado en el tubo de ensayo para depositar un hisopo nasal con muestra de ensayo biológica de primera generación en el medio;

25 La FIGURA 4 es una vista en alzado lateral del tubo de ensayo de la FIGURA 3 después de que la muestra de ensayo se ha depositado y cultivado en el medio durante un periodo de tiempo y que indica la ausencia de *S. aureus* en la muestra de ensayo; y

La FIGURA 5 es una vista en alzado lateral del tubo de ensayo similar a la FIGURA 4 pero que muestra el medio del tubo de ensayo después del periodo de cultivo y que indica la presencia de *S. aureus* en la muestra de ensayo.

30 **Descripción detallada de realizaciones específicas de la invención**

Los dibujos muestran la detección de *S. aureus*. La introducción de un inductor de gen *MecA* eficaz para destruir cualquier MSSA vuelve al método/mezcla adecuado para la presente invención.

35 La FIGURA 1 es una vista en alzado lateral de un tubo de ensayo indicado por el número 2 que preferentemente tiene un fondo plano 4 y un cierre superior 3 y que contiene una mezcla de ensayo en polvo seco 1 que se forma para detectar la presencia o ausencia de *S. aureus* en una muestra; por ejemplo, una muestra biológica de primera generación. El tubo 2 también está provisto de una línea de referencia 5 que indica la cantidad de agua que se tiene que añadir al tubo 2 con el fin de hidratar de forma apropiada la mezcla en polvo 1 para el ensayo de la muestra de ensayo.

40 Las mezclas de ensayo hidratadas aceptables se pueden preparar usando los siguientes constituyentes en los intervalos indicados, para crear 15 ml de mezcla de ensayo:

| Constituyente | Ejemplo Específico de Cantidades de Constituyente por 15 ml de Mezcla de Ensayo: | Intervalo de Cantidades de Constituyente por 15 ml de Mezcla de Ensayo: |
|-------------------|--|---|
| Caldo de Nitrato | 7,5 ml | 1,0 ml - 9,0 ml |
| Agua | 7,5 ml | 1,0 ml - 9,0 ml |
| Uracilo | 10,0 mg | 1,0 mg - 20,0 mg |
| Piruvato de Sodio | 10,0 mg | 1,0 mg - 20,0 mg |
| L-glutamina | 20,0 mg | 5,0 mg - 40,0 mg |
| Sulfito de Sodio | 1,0 mg | 0,5 mg - 2,0 mg |
| Plasma de Conejo | 100,0 mg | 15,0 mg - 500,0 mg |
| Fibrinógeno | 100,0 mg | 15,0 mg - 500,0 mg |

45 El ejemplo específico de las cantidades de constituyente por 15 ml de mezcla de ensayo proporcionado anteriormente representa una formulación de mezcla de ensayo particular que se ha ensayado y que se ha observado que se comporta de forma satisfactoria. Este ejemplo específico no representa todas las formulaciones de mezcla de ensayo. Como se ha indicado anteriormente, los expertos en la técnica reconocerán que se pueden usar muchas combinaciones diferentes de constituyentes y cantidades relativas variables de los mismos para proporcionar la misma funcionalidad. Por lo tanto, el presente método y mezcla contempla que varias formulaciones de constituyentes diferentes se pueden preparar dentro de los intervalos mencionados anteriormente.

Como se indica en la FIGURA 2, la mezcla en polvo 1 se hidrata de forma apropiada mediante la adición de agua, preferentemente agua destilada, para formar una mezcla de ensayo hidratada 6 en la cual se deposita la muestra (por ejemplo, portada en un hisopo nasal).

5 Las muestras de ensayo de primera generación se pueden recoger mediante una diversidad de técnicas diferentes; por ejemplo, una muestra humana se puede recoger pasando un hisopo dentro de la nariz de un sujeto. Los hisopados nasales son una manera particularmente conveniente de recoger una muestra de ensayo, pero no son el único método de recolección; por ejemplo, muestras de ensayo se pueden recoger a partir de hisopados de garganta, lesiones dérmicas, piel no dañada, etc. Las muestras ambientales de primera generación se pueden
10 recoger mediante diversos métodos conocidos; por ejemplo, pasando o frotando una superficie usando un paño/hisopo seco o húmedo. Igualmente, las muestras de alimentos de primera generación se pueden recoger a partir del propio alimento o limpiando restos de alimentos a partir de superficies que están en contacto con el alimento, etc. Una vez que la muestra se ha recogido, la misma se puede depositar en la mezcla de ensayo hidratada 6; por ejemplo, usando el mismo hisopo de algodón 8 que se ha usado para recoger la muestra de primera
15 generación a partir de la superficie del mismo. Una vez que la muestra de ensayo se deposita en la mezcla de ensayo 6, la misma se incuba dentro de la mezcla de ensayo durante un periodo de tiempo típicamente menor a veinticuatro horas. La incubación puede producirse a cualquier temperatura que sea aceptable en esas circunstancias. Después del periodo de inoculación, el recipiente (por ejemplo, tubo de ensayo 2) que contiene la mezcla de ensayo inoculada se puede inspeccionar para determinar la presencia de un coágulo; por ejemplo, el tubo
20 de ensayo 2 se puede inclinar hacia un lado como se muestra en las FIGURAS 4 y 5 para observar si el menisco 10 de la mezcla de ensayo se mueve o si un coágulo mantiene la mezcla de ensayo por debajo de una línea de referencia 5. La presencia de un coágulo indica que *S. aureus* está presente en la muestra de ensayo y la ausencia de un coágulo en la mezcla de ensayo inoculada indica que *S. aureus* no está presente en la mezcla de ensayo 6, como se muestran en la FIGURA 4. En algunos casos, la mezcla de ensayo inoculada completa coagulará y en otros permanecerá algún líquido en el recipiente con el coágulo. Aproximadamente el 80% de los presentes ensayos
25 realizados usando muestras nasales de primera generación coagularon dentro de seis horas cuando *S. aureus* estaba presente en la muestra de ensayo de primera generación.

Para determinar la eficacia del método y mezcla, se llevó a cabo un estudio de control que implicaba sesenta (60)
30 muestras de control tituladas para contener cantidades variables de MSSA y sesenta (60) muestras de control que contenían cantidades variables de MRSA. Los clones convencionales de MSSA y MRSA se cultivaron en caldo de tripticosa soja (TSB) y se diluyeron mediante aumentos log 10. La mezcla de ensayo se inoculó con una cantidad establecida (0,1 ml) de cada una de las muestras de control. Un primer grupo de las mezclas de ensayo inoculadas se incubó a 35 °C y un segundo grupo de las mezclas de ensayo inoculadas se incubó a 23 °C. De las sesenta
35 muestras de ensayo de control, todas fueron positivas para *S. aureus* en cinco horas, cuarenta y nueve (49) fueron positivas en cuatro horas; treinta seis (36) fueron positivas en tres horas y (24) en dos horas. Los datos que detallan la relación entre la concentración del inóculo y la temperatura de incubación fueron los siguientes:

| S. aureus UFC/ml | Coágulo a 35 °C | Coágulo a 23 °C |
|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 7 log 10 | 2,0 h | 3,0 h |
| 6 log 10 | 3,0 h | 3,0 h |
| 5 log 10 | 4,0 h | 4,0 h |
| 4 log 10 | 6,0 h | 7,0 h |
| 3 log 10 | 10,0 h | 11,5 h |
| 2 log 10 | 15,0 h | 21,0 h |

40 La concentración de *S. aureus* dentro de los coágulos fue al menos 5 log 10.

Adicionalmente al estudio de control descrito anteriormente, se llevó a cabo un estudio clínico usando cincuenta
muestras. Las muestras se obtuvieron a partir de una unidad médica de cuidados intensivos cultivando muestras
45 nasales de pacientes. Los pacientes no se identificaron ni los resultados de ningún cultivo "convencional" estuvieron disponibles (protocolo de FDA). Las muestras se sembraron en agar manitol sal (MSA) usando hisopos. Después de sembrar en placas las muestras en MSA, los hisopos se usaron para inocular la mezcla de ensayo. La coagulación se observó para cada hora durante veinticuatro horas. No hubo falsos positivos.

| Bacteria | Número de muestras detectadas positivas para bacterias identificadas mediante tanto el método de MSA como el presente método: | Número de muestras detectadas positivas para bacterias identificadas mediante el presente método en solitario: | Número de muestras detectadas positivas para bacterias identificadas mediante el método de MSA en solitario: |
|----------|---|--|--|
| MSSA* | 9 | 2 | - |
| MRSA** | 13 | 2 | 1 |

* ensayo no de acuerdo con la invención ; ** ensayo de acuerdo con la invención

Quando se observó un coágulo, una parte del coágulo se retiró y disolvió. Se llevó a cabo un recuento cuantitativo de UFC/ml a partir del material de coágulo disuelto.

5 El presente método/mezcla incluye medios para distinguir entre MSSA y MRSA. Por ejemplo, se puede incluir cefoxitina en una concentración de aproximadamente 10-100 mg/ml u otro inductor de gen *MecA* en la mezcla de ensayo. Cualquier MSSA presente dentro de la muestra de ensayo se destruirá, pero MRSA no. Por tanto, si se forma un coágulo, el *S. aureus* en la muestra de ensayo habrá demostrado ser MRSA. Si se forma un coágulo y se confirma la presencia de MRSA, entonces el coágulo se puede disolver con el fin de llevar a cabo análisis adicionales de la bacteria *S. aureus* detectada.

15 Se apreciará que el ensayo de la presente invención es significativamente más sencillo de llevar a cabo que los ensayos convencionales que están actualmente en uso, como se tipifica mediante el procedimiento de plasma coagulasa sugerido por Remel Products, Thermo Fisher Scientific, Lenexa, Kansas, EE.UU. El procedimiento de Remel que está aprobado por la FDA y aparece en el código del Registro Federal es un ensayo de exención, requiere un ensayo de dos etapas para *S. aureus* donde las colonias de microbios a partir de la muestra de ensayo se cultivan en primer lugar en un medio de agar y se exploran para determinar colonias de *S. aureus* sospechosas usando una tinción gram y ensayo de portaobjetos de catalasa antes de proceder a una segunda etapa de ensayo de coagulasa. Existen complicaciones con relación de este tipo de ensayo de coagulasa, específicamente: 1) las colonias para ensayo de coagulasa no se deben recoger a partir de medios que contienen concentraciones elevadas de sal ya que se pueden producir resultados falsos positivos; 2) en el procedimiento de ensayo de portaobjetos de primera etapa, el organismo/suspensión salina se tiene que observar para autoaglutinación antes de la adición del plasma de coagulasa para evitar una lectura de ensayo de falso positivo; y 3) las reacciones falsas negativas de coagulasa pueden ocurrir si el cultivo de ensayo es mayor de 18-24 horas o si existe escaso crecimiento.

30 Aunque la invención se ha descrito con respecto a realizaciones preferidas, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que se pueden realizar diversos cambios y/o modificaciones a la invención sin alejarse del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia o ausencia de *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilina ("MRSA") en una muestra de ensayo de primera generación, donde una muestra de ensayo de primera generación es una muestra de ensayo no tratada recogida directamente a partir de una muestra de ensayo biológica, ambiental o de alimento, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5
- a) proporcionar una mezcla de ensayo que incluye constituyentes promotores del crecimiento que facilitan la multiplicación de *Staphylococcus aureus* ("*S. aureus*"), sustratos de coagulasa con capacidad para reaccionar con coagulasa producida por *S. aureus* para crear un coágulo, donde se incluyen plasma y fibrinógeno como una fuente de sustratos de coagulasa y una cantidad de un inductor de gen MecA eficaz para destruir cualquier *Staphylococcus Aureus* Sensible a Metilina ("MSSA") en la muestra de ensayo de primera generación;
- 10
- b) inocular la mezcla de ensayo con la muestra de ensayo de primera generación;
- c) incubar la mezcla de ensayo inoculada a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 42 °C, y
- 15
- d) observar la mezcla de ensayo inoculada para observar la presencia o ausencia de un coágulo dentro de la mezcla inoculada.
2. El método de la reivindicación 1 donde la mezcla de ensayo se hidrata antes de llevar a cabo la etapa de inocular la mezcla de ensayo con la muestra de ensayo de primera generación.
- 20
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde el plasma es plasma de conejo.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde los constituyentes promotores del crecimiento incluyen uno o más de los siguientes: una fuente de nitrato, una fuente de proteína, un material con capacidad para ayudar a la generación de síntesis de ácido nucleico y una fuente de energía para el *S. aureus* y una fuente de factor de crecimiento de aminoácidos.
- 25
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la mezcla de ensayo incluye:
- 30
- a) una cantidad eficaz de aminoácidos;
- b) una cantidad eficaz de fuentes de nitrógeno;
- c) una cantidad eficaz de sales;
- d) una cantidad eficaz de vitaminas;
- 35
- e) una cantidad eficaz de calcio;
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo además la etapa de recoger la muestra de primera generación mediante uno de: a) hisopado de un conducto nasal de un sujeto humano; b) hisopado de una superficie ambiental; y c) toma de muestras de una muestra de ensayo de alimento.
- 40
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la mezcla de ensayo es una mezcla seca capaz de hidratarse.
8. Una mezcla de ensayo para su uso en la detección de la presencia o ausencia de *Staphylococcus Aureus* Resistente a Metilina ("MRSA") en una muestra de ensayo de primera generación, donde una muestra de ensayo de primera generación es una muestra de ensayo no tratada recogida directamente a partir de una muestra de ensayo biológica, ambiental o de alimento, comprendiendo la mezcla de ensayo:
- 45
- a) una cantidad eficaz de aminoácidos;
- 50
- b) una cantidad eficaz de fuentes de nitrógeno;
- c) una cantidad eficaz de sales;
- d) una cantidad eficaz de vitaminas;
- e) una cantidad eficaz de calcio;
- f) una cantidad eficaz de sustratos de coagulasa con capacidad para producir un coágulo dentro de la mezcla de ensayo en presencia de *S. aureus* en la muestra de ensayo de primera generación y donde se incluyen plasma y fibrinógeno como una fuente de sustratos de coagulasa;
- 55
- g) una cantidad de un inductor de gen MecA eficaz para destruir cualquier *Staphylococcus Aureus* Sensible a Metilina ("MSSA") en la muestra de ensayo de primera generación.
9. La mezcla de ensayo de la reivindicación 8, donde el inductor de gen MecA es cefoxitina.
- 60
10. La mezcla de ensayo de la reivindicación 8 o 9, donde el plasma es plasma de conejo.
11. La mezcla de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la mezcla de ensayo es un líquido.
- 65

12. La mezcla de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la mezcla de ensayo es una mezcla seca que es capaz de hidratarse.