

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 773**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C07H 1/08 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2007 E 07766074 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2018425**

54 Título: **Procedimiento de extracción de los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de microorganismos eventualmente presentes en una muestra de sangre**

30 Prioridad:

19.05.2006 FR 0604531

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

07.01.2014

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON INFUSION THERAPY
SYSTEMS INC. (100.0%)**

**1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**HERMET, JEAN-PIERRE;
BESSON-FAURE, ISABELLE y
HOULLE-DECLOMESNIL, ANNE-ELODIE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 436 773 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).

Procedimiento de extracción de los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de microorganismos eventualmente presentes en una muestra de sangre

DESCRIPCIÓN

- 5 La presente invención se refiere al campo de la detección y de la identificación de microorganismos eventualmente presentes en una muestra de sangre. Esta se refiere de manera más particular a un procedimiento de extracción de los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de microorganismos eventualmente presentes en una muestra de sangre para su identificación.
- 10 El desarrollo de métodos simples y rápidos que permitan la detección y/o la identificación y/o la determinación del porcentaje de microorganismos eventualmente presentes en una muestra de sangre es un reto fundamental en particular en el campo de la salud.
- 15 Actualmente, los métodos de biología molecular y, de manera particular, las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) están en plena expansión.
- En efecto, estas técnicas presentan una gran sensibilidad y especificidad para la identificación y/o la cuantificación de los microorganismos. Sin embargo, la aplicación de estos métodos de biología molecular y, de manera particular, las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) a muestras de sangre presenta dificultades, en particular en términos de sensibilidad y de realización.
- 20 En efecto, las muestras de sangre comprenden unos agentes inhibidores de las técnicas de biología molecular y en particular unas técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP).
- 25 Estos agentes inhibidores pueden interferir con los procedimientos de extracción de ADN y/o degradar los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de las células y/o inhibir la actividad de las enzimas, en particular de las polimerasas utilizadas en diferentes técnicas de biología molecular.
- 30 A título de ejemplo de este tipo de agentes inhibidores en concreto de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP), en particular presentes en la sangre total, se pueden citar los iones de calcio, la hemoglobina, la lactoferrina, la hemina, la urea y la heparina de la sangre (Al-Soud, W. A. y Radstrom, P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J. Clin. Microbiol. 39: 2, págs. 485-493). Sigue existiendo, por lo tanto, la necesidad de unos procedimientos de extracción de ADN de los microorganismos
- 35 presentes en una muestra de sangre, para su detección y/o su identificación.
- Los inventores han descubierto un procedimiento particular que permite resolver por completo o en parte los problemas mencionados con anterioridad.
- 40 De acuerdo con un primer aspecto, la invención tiene por objeto un procedimiento de extracción de ADN de los microorganismos eventualmente presentes en una muestra de sangre que comprende las siguientes etapas:
- 45 i) la filtración de una muestra de sangre a través de una membrana de filtración cuyos poros presentan un diámetro que va de 0,01 μm a 50 μm , en particular de 0,1 μm a 10 μm , y de manera más particular de 0,2 μm a 1 μm ;
- ii) el lavado de dicha membrana de filtración, en el cual dicho lavado lisa los glóbulos rojos de la muestra de sangre; y
- iii) la extracción de los ácidos desoxirribonucleicos de los microorganismos eventualmente presentes en dicha membrana de filtración.
- 50 Se entiende por « muestra de sangre » en el sentido de la presente invención una muestra de sangre completa o de hemocultivo, que se ha tratado eventualmente para reducir el nivel y/o eliminar los glóbulos rojos y/o las plaquetas presentes en dicha muestra.
- 55 La etapa de tratamiento de una muestra de sangre para reducir el nivel y/o eliminar los glóbulos rojos y/o las plaquetas presentes en dicha muestra se puede realizar de acuerdo con unas técnicas que conoce bien el experto en la materia.
- A título de ejemplos de estas técnicas, se pueden citar las que se describen en la Solicitud PCT WO 03/025207:
- 60 – la técnica de agregación plaquetaria por medio de agentes de agregación como anticuerpos específicos de un antígeno plaquetario, seguida de la filtración de la muestra tratada;
- 65 – la técnica de aglutinación de los glóbulos rojos por medio de agentes de agregación como las lectinas, seguida de la filtración de la muestra tratada.

- Las muestras de sangre completa se pueden obtener de acuerdo con unas técnicas que conoce bien el experto en la materia por medio, por ejemplo, de una jeringuilla provista de una aguja que se introduce en particular en una vena del antebrazo o del pliegue del codo de un individuo. Una muestra de entre 1 y 10 ml de sangre extraída en particular con un anticoagulante, en particular EDTA, citrato de sodio o heparina, obtenida de un sujeto humano o animal puede ser suficiente para aplicar el procedimiento de acuerdo con la presente invención.
- Las muestras de sangre de hemocultivo se pueden obtener tras la siembra de la sangre completa extraída de un humano o animal en unos medios de cultivo adecuados para el desarrollo de los microorganismos.
- Una membrana de filtración adaptada para el procedimiento de acuerdo con la invención la puede identificar de forma simple el experto en la materia dados sus conocimientos generales.
- En particular, la membrana de filtración de acuerdo con la invención se puede seleccionar dentro del grupo que comprende las membranas de fluoruro de polivinilideno, de poliéster, de nailon, de polipropileno, de policarbonato y de polietersulfona, en particular de fluoruro de polivinilideno.
- De preferencia, dicha membrana de filtración no es a base de celulosa.
- La etapa i) de filtración del procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo por medio de dispositivos y de soportes de filtro que conoce bien el experto en la materia, en particular un soporte como el que se describe en la Solicitud de Patente US 2004/0208796.
- En la etapa ii) se entiende por « lavado » una etapa que permite reducir el nivel de impurezas retenidas en la membrana de filtración permitiendo al mismo tiempo que al menos una parte de los microorganismos se mantengan en dicha membrana.
- Las impurezas pueden ser, en particular, agentes inhibidores de las técnicas de biología molecular (Wilson, J.G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63: 10, págs. 3.741-3.751), en particular:
- proteínas plasmáticas, las inmunoglobulinas G (Al-Soud, W. A., Jonsson, L. J., y Radstrom, P. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. J. Clin. Microbiol. 38: 1, págs. 345-350);
 - enzimas (proteasas);
 - poliaminas;
 - polianetol sulfonato de sodio (SPS);
 - anticoagulantes sanguíneos como la heparina (Satsangi, J., Jewell, D. P., Welsh, K., Bunce, M., y Bell, J. I. 1994. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet 343: 8.911, págs. 1.509-1.510) y el ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Al-Soud, W. A. y Radstrom, P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J. Clin. Microbiol. 39: 2, págs. 485-493);
 - la hemoglobina, la hemina (Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Tahahashi, S., y Kimura, K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J. Forensic Sci. 39: 2, págs. 362-372), la bilirrubina, los fenoles;
 - detergentes como el dodecil sulfato de sodio, el Triton X100; y
 - los ácidos biliares.
- Dicha etapa ii) permite lisar, en particular mediante choque hipotónico, los glóbulos rojos de la muestra de sangre y, en concreto, eliminar su contenido, en particular la hemoglobina contenida en estos glóbulos rojos.
- El experto en la materia podrá determinar de forma simple el volumen de solución de lavado utilizada en la etapa ii) dados sus conocimientos generales.
- El volumen de solución de lavado puede corresponder a un volumen comprendido entre $\frac{1}{4}$ y 20, en particular entre $\frac{1}{2}$ y 10 y, de manera más particular entre 1 y 5 veces el volumen de la muestra de sangre filtrada en la etapa i).
- Por ejemplo, cuando la muestra de sangre filtrada en la etapa i) tiene un volumen que va de 0,2 a 5 ml y de manera más particular de 0,5 a 1 ml, entonces la etapa ii) de lavado se puede llevar a cabo con un volumen de solución de lavado que va de 1 a 10 ml, en particular de 3 a 5 ml, y de manera más particular de 3 ml.

También a título de ejemplo, cuando la muestra de sangre filtrada en la etapa i) tiene un volumen que va de 5 a 100 ml, de manera más particular de 5 a 20 ml, entonces la etapa ii) de lavado se puede llevar a cabo con un volumen de solución de lavado que va de 5 a 50 ml, en particular de 8 a 20 ml, y de manera más particular de 10 ml.

5 La solución de lavado adaptada para el procedimiento de acuerdo con la invención la puede identificar de forma sencilla el experto en la materia dados sus conocimientos generales.

La solución de lavado se puede seleccionar en particular entre las soluciones acuosas, en particular agua y, de manera más particular, agua osmotizada, de preferencia esterilizada mediante su filtración.

10 Dicha esterilización del agua mediante filtración se puede realizar en particular utilizando una membrana de filtración cuyos poros pueden presentar un diámetro de aproximadamente 0,22 µm.

15 A título de ejemplos de soluciones de lavado que se pueden utilizar para la etapa ii) de lavado de acuerdo con la invención, se puede citar el agua pura para biología molecular disponible de la empresa Eppendorf con en particular la referencia 0032.006.159, el agua pura procedente de los sistemas conocidos de purificación con, en particular, el sistema Purelab® de la empresa ELGA Labwater, o el sistema Milli-Q® de la empresa Millipore, o el sistema Infinity UV/UF® de la empresa Werner.

20 Cuando el procedimiento de acuerdo con la invención utiliza un dispositivo y/o un soporte de filtro, la etapa ii) de lavado se puede llevar a cabo, en particular, mediante el paso de la solución de lavado por dicha membrana de filtración, dejando colocada la membrana de filtración dentro del dispositivo y/o sobre el soporte de filtro utilizado en la etapa i).

25 La etapa de extracción de los ácidos desoxirribonucleicos de microorganismos eventualmente presentes en dicha membrana de filtración se puede llevar a cabo de acuerdo con las técnicas que conoce bien el experto en la materia, como los métodos de lisis física en particular térmica o por sonicación, los métodos de lisis química, descritos en particular en el manual de Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. (Molecular cloning: a laboratory manual, 2º ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, N. Y., 1989).

30 Se entiende por « microorganismo » un organismo vivo que pertenece a uno de los tres reinos siguientes, el de los monómeros, de los protistas y de los protozoos. Los microorganismos presentan una estructura celular eucariota o procariota, o acariota, un tamaño microscópico o ultramicroscópico y son unicelulares. A título de ejemplos de microorganismos, se pueden citar:

- las bacterias como Escherichia coli, klebsiella, shigella, estreptococos, estafilococos, enterococos, proteus, enterobacter, serratia, pseudomonas, bacilos, corinobacterias, listeria, acinetobacter, criptococos, bartonella, micobacterias; y
- los hongos como candida, aspergillus.

40 De manera más particular, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende, además, la siguiente etapa:

- iv) la identificación de los microorganismos, en particular de las bacterias, de los virus, de los protozoos y/o de los hongos eventualmente presentes en dicha muestra de sangre.

45 Se entiende por « identificación » la determinación de la especie de un microorganismo.

La identificación de los microorganismos se puede llevar a cabo a partir de los ácidos desoxirribonucleicos extraídos de dichos microorganismos mediante técnicas de biología molecular que conoce bien el experto en la materia.

50 En particular, la etapa iv) comprende el uso de una técnica que utiliza una actividad de tipo polimerasa seleccionada dentro del grupo que comprende la reacción en cadena de la polimerasa en punto final, la reacción en cadena de la polimerasa multiplex, la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa, la reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

55 En el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden utilizar unos aparatos de RCP en punto final disponibles en particular de la empresa Applied Biosystems bajo la denominación « ABI PRISM® », de la empresa Roche Diagnostics bajo la denominación « COBAS Amplicor® ».

60 En el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden utilizar unos aparatos de RCP en tiempo real disponibles en particular de la empresa Applied Biosystems bajo la denominación « 7500 Real-Time PCR System® », de la empresa Roche Diagnostics bajo la denominación « COBAS Taqman® » y de la empresa Genesystems bajo la denominación « GeneDisc cyclor® ».

65 En el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden utilizar unos kits de RCP en tiempo real con unos pares de cebadores y sondas específicas de un microorganismo disponibles de la empresa Roche con el « Lightcycler

5 SeptiFast kit® » (con las referencias 04469046001 o 04488814001); de la empresa Biotage con los kits « microbial species determination and resistance » con la referencias 8, 7 y 12; de la empresa BAG (Biologish Analysensystem GmbH) con los kits « Hyplex StaphyloResist® » con la referencia 3801, « Hyplex StaphyloResist » con la referencia 3809, « Hyplex EnteroResist® » con la referencia 3802. Por ejemplo, el kit de RCP en tiempo real disponible de la empresa Argène, con la referencia 69-002, se puede utilizar para identificar y determinar el porcentaje de virus de Epstein-Barr (EBV) presente en una muestra de sangre.

10 De acuerdo con un modo particular de realización de la invención, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende, además, la siguiente etapa:

v) la identificación de al menos un gen de resistencia a un antibiótico en al menos un microorganismo eventualmente presente en dicha muestra de sangre.

15 La identificación de un gen de resistencia a un antibiótico a partir de los ácidos desoxirribonucleicos extraídos de los microorganismos se puede llevar a cabo mediante unas técnicas de biología molecular que conoce bien el experto en la materia.

20 En particular la etapa v) comprende el uso de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa con, en particular, unos pares de cebadores y eventualmente unas sondas específicas de al menos un gen de resistencia a un antibiótico.

De acuerdo con otro modo particular de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende, además, la siguiente etapa:

25 vi) la determinación del porcentaje de microorganismos en particular bacterias, virus, protozoos y/u hongos eventualmente presentes en dicha muestra de sangre.

30 Se entiende por « porcentaje de microorganismos » la cantidad de microorganismos presentes en la muestra de sangre a la cual se aplica el procedimiento de acuerdo con la invención.

La determinación del porcentaje de microorganismos eventualmente presentes en dicha muestra de sangre se puede llevar a cabo mediante unas técnicas que conoce bien el experto en la materia.

35 A título de ejemplo, esta determinación se puede llevar a cabo comparando los resultados obtenidos en la etapa iv) de identificación de los microorganismos con los resultados obtenidos con unos controles positivos correspondientes a unas diluciones determinadas de dichos microorganismos.

En particular, la etapa vi) comprende el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

40 De manera ventajosa, al menos una de las etapas iv), v), vi) del procedimiento de acuerdo con la invención se realiza en un medio adaptado a al menos una técnica de biología molecular, que comprende un extracto de los ácidos desoxirribonucleicos de los microorganismos obtenido en la etapa iii).

45 Se entiende por « medio adaptado a al menos una técnica de biología molecular », un medio que comprende unos agentes que permiten aumentar el rendimiento y/o la sensibilidad y/o la especificidad de estas técnicas, en particular de las reacciones de cadena de la polimerasa.

50 Dichos medios los conoce bien el experto en la materia, como se describen en la literatura (Wilson, J. G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Appl. Environ. Microbiol., 63: 10, págs. 3.741-3.751).

55 A título de ejemplo de medios adaptados a las técnicas de PCR, se pueden citar los medios que comprenden en particular albúmina sérica bovina (Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Tahahashi, S., y Kimura, K. 1994. Identification of the heme compound copurified with desoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J. Forensic Sci. 39:2, págs. 362-372), glicerol, iones de magnesio (Satsangi, J., Jewell, D. P., Welsh, K., Bunce, M., y Bell, J. I. 1994. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet 343: 8.911, págs. 1.509-1.510), trimetil glicina, dimetilsulfóxido, polietileno glicol, Tween 20®, Tween 40®, Tween 80®, DMSO, Triton X-100®, Triton X-114®, monohidrato de betaína, betaína trimetilglicina, PEG 35000, PEG 400, PEG 6000 y acetamida.

60 De acuerdo con un modo particular de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende, de forma previa a la etapa i), las siguientes etapas:

a) la adición a la sangre completa o al hemocultivo de una solución de aglutinación de los glóbulos rojos y/o de una solución de agregación plaquetaria; y

65 b) la filtración de la preparación obtenida en la etapa a) a través de un filtro cuyos poros presentan un diámetro que va de 2 µm a 50 µm, en particular que va de 10 µm a 25 µm, y de manera más particular de 17 µm.

En particular, dicha solución de aglutinación de los glóbulos rojos comprende al menos un agente de aglutinación seleccionado dentro del grupo que comprende las lectinas, la polietilenimina, la polivinilpirrolidona, las gelatinas, los dextranos y los polietileno glicoles, en particular las lectinas.

- 5 De manera más particular, las lectinas se seleccionan dentro del grupo que comprende las lectinas de *lens culinaris*, *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Vicia faba* y de *Erythrina corallodendron*.

10 El agente de aglutinación, en particular la lectina, puede estar presente en la solución de aglutinación en una concentración que va de 10 µg/ml a 200 µg/ml, en particular de 15 µg/ml a 100 µg/ml, y de manera más particular de 20 µg/ml a 30 µg/mol.

15 En particular, dicha solución de agregación plaquetaria comprende al menos un agente de agregación plaquetaria seleccionado dentro del grupo que comprende los anticuerpos específicos de un antígeno plaquetario, la trombina, la tripsina, el colágeno, el tromboxano A2, el factor de activación plaquetaria, la adrenalina, el ácido araquidónico, la serotonina y la epinefrina, en particular los anticuerpos específicos de un antígeno plaquetario y el colágeno.

20 Los anticuerpos específicos de un antígeno plaquetario pueden estar presentes en la solución de agregación plaquetaria en una concentración que va de 0,5 µg/ml a 100 µg/ml, en particular de 1 µg/ml a 60 µg/ml, y de manera más particular de 5 µg/ml a 45 µg/ml.

El colágeno puede estar presente en la solución de agregación plaquetaria en una concentración que va de 0,05 µg/ml a 50 µg/ml, en particular de 1 µg/ml a 20 µg/ml.

25 Se mostrarán otras ventajas y características de la invención a la vista de las figuras y de los ejemplos que vienen a continuación.

Las figuras y los ejemplos que siguen se dan a título ilustrativo y no limitativo:

- 30 – La figura 1 (A y B) ilustra la identificación y la cuantificación de Escherichia Coli presentes en unas muestras de sangre de sangre completa. La figura 1A ilustra en forma de curva los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de Escherichia Coli. La figura 1B ilustra en forma de tabla el ciclo umbral y la amplitud de las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- 35 – La figura 2 (A y B) ilustra la identificación y la cuantificación de Staphylococcus epidermidis presentes en unas muestras de sangre de sangre completa. La figura 2A ilustra en forma de curva los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de Staphylococcus epidermidis. La figura 2B ilustra en forma de una tabla el ciclo umbral y la amplitud de las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- 40 – La figura 3A muestra una foto de un gel de agarosa después de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en punto final y migración utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de Escherichia coli.
- La figura 3B muestra los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa (RCP) cuantitativas en tiempo real utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de Escherichia coli.
- 45 – La figura 4 ilustra en forma de curvas la identificación y la cuantificación de Escherichia coli, de Staphylococcus epidermidis y de Klebsiella oxytoca presentes en unas muestras de sangre de hemocultivo. La figura 4 ilustra en forma de curva los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de Escherichia coli, de Staphylococcus epidermidis y de Klebsiella oxytoca.
- 50 – La figura 5 ilustra en forma de curvas la identificación y la cuantificación de Escherichia coli presentes en unas muestras de sangre de sangre completa extraída con EDTA (figura 5A) y con citrato de sodio (figura 5B) y de Staphylococcus epidermidis presentes en unas muestras de sangre de sangre completa extraída con heparina (figura 5C). La figura 5 ilustra en forma de curva los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de Escherichia coli y de Staphylococcus epidermidis.

55

Ejemplos

I. Ejemplo I: Procedimiento de preparación de muestras de sangre

60 I.1 Procedimiento de preparación de muestras de sangre de hemocultivos

Se han extraído 100 µl de muestra de sangre de hemocultivo por medio de una jeringuilla estéril a través de la membrana de los frascos de hemocultivos. A continuación se ha añadido a cada muestra 1 ml de agua osmotizada filtrada (por medio de un filtro cuyos poros presentan un diámetro de aproximadamente 0,22 µm).

65

Se ha filtrado cada muestra a través de una membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno con un diámetro de entre 25 y 32 mm y cuyos poros presentan un diámetro que va de 0,2 µm a 1 µm. La membrana de filtración estaba contenida en un soporte de filtro como se describe en la solicitud de patente US 2004/0208796.

5 A continuación se ha lavado cada membrana de filtración con entre 1 y 10 ml de agua pura u osmotizada, mediante su filtración por medio de un filtro cuyos poros presentan un diámetro de aproximadamente 0,22 µm.

Después de la filtración, se ha recuperado cada membrana de filtración por medio de unas pinzas estériles y se ha insertado dentro de un microtubo estéril que contenía entre 200 µl y 1 ml:

- 10
- de agua pura para biología molecular como la que comercializa Eppendorf; o
 - de agua pura para biología molecular adicionada con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,7 %; o
 - de agua pura para biología molecular adicionada con Tris HCl 125 mM, con betaína 160 mM y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 %, con un pH de 9,3 ajustado mediante NaOH 1 M.

15 **II.2 Procedimiento de preparación de muestras de sangre de sangre completa**

Se han añadido 5 ml de sangre completa extraídas con un anticoagulante (EDTA, heparina o citrato de sodio) a 20 ml de solución de aglutinación de los glóbulos rojos.

20 Dicha solución de aglutinación que comprende la lectina *lens culinaris* a 25 µg/ml, polietileno glicol (PEG) al 1 % en un medio que contiene un 75 % de caldo de infusión corazón-cerebro y un 25 % de Tryptone Soy Broth (TSB).

25 Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, los glóbulos rojos se han aglutinado en el precipitado.

Se han extraído entre 15 y 20 ml de sobrenadante del precipitado de glóbulos rojos y se han incubado en presencia de 1 ml de solución de agregación plaquetaria.

30 Dicha solución de agregación comprende el anticuerpo monoclonal anti-CD9 con 45 µg/ml en un medio que contiene un 75 % de caldo de infusión corazón-cerebro y un 25 % de TSB.
Después de la agregación de las plaquetas se ha filtrado la preparación a través de un filtro cuyos poros presentan un diámetro de aproximadamente 17 µm.

35 Esta etapa de filtración ha permitido retener en el filtro los agregados plaquetarios y las células sanguíneas de tamaño superior al tamaño de los poros del filtro.

40 A continuación se ha filtrado de nuevo el filtrado a través de una membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno con un diámetro de entre 25 y 32 mm y cuyos poros presentan un diámetro que va de 0,2 µm a 1 µm. La membrana de filtración estaba contenida en un soporte de filtro como se describe en la Solicitud de Patente US 2004/0208796.

A continuación se ha lavado la membrana de filtración con entre 8 y 20 ml de agua pura u osmotizada, mediante su filtración.

45 Después de la filtración, se ha recuperado la membrana de filtración por medio de unas pinzas estériles y se ha insertado dentro de un microtubo estéril que contenía entre 200 µl y 1 ml bien:

- de agua pura para biología molecular como la que comercializa Eppendorf; o bien
- de agua pura para biología molecular adicionada con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,7 %; o bien
- 50 - de agua pura para biología molecular adicionada con Tris HCl 125 mM, con betaína 160 mM y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 %, con un pH de 9,3 ajustado mediante NaOH 1 M.

II. Ejemplo II: Identificación de microorganismos presentes en unas muestras de sangre

55 **II.1 Procedimiento de extracción de ADN**

La extracción de ADN se ha realizado a partir de las membranas de filtración contenidas dentro de los microtubos estériles, obtenidas después de la aplicación de los procedimientos descritos en el ejemplo 1.

60 Se ha sometido a cada microtubo a una sucesión de etapas de calentamiento y/o sonicación, y/o congelación como se describen en el Maniatis (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. en « Molecular cloning » (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

65 **II.2 Técnicas de Reacción en cadena de la polimerasa (RCP) utilizadas**

II.2.1 Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) cuantitativa en tiempo real

Se han añadido entre 30 y 42 µl de ADN extraídos de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo anterior (II.1) a 30 µl de mezcla que contiene la polimerasa Taq® y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) en un medio tamponado.

5 Se han depositado 12 µl de esta preparación en unos pocillos que contienen la sonda fluorescente y el par de cebadores específicos de las cepas de microorganismos que hay que detectar como se describen en la Solicitud PCT WO 2004/024944. El control negativo corresponde a un pocillo carente de sonda fluorescente.

10 El control positivo corresponde a un pocillo que comprende una secuencia sintética de ADN con las sondas fluorescentes y el par de cebadores específicos de dicha secuencia.

Los resultados se han expresado, por una parte, en forma de curvas de amplificación que muestran la variación de intensidad de la fluorescencia en función de los ciclos de amplificación (curvas presentadas en las figuras 1, 2 y 4).

15 Por otra parte, las tablas de las figuras 1 y 3 presentan para cada reacción en cadena de la polimerasa realizada:

- el ciclo umbral o Ct, que corresponde al número mínimo de ciclos necesario para alcanzar la fase exponencial de amplificación del ADN;
- la amplitud que corresponde a la diferencia entre la intensidad de fluorescencia máxima y mínima obtenida.

20 II.2.2 Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) clásica, a continuación migración en gel de agarosa. Se han añadido 7 µl de ADN extraídos de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo anterior (II.1) a 43 µl de una mezcla que contiene polimerasa Taq®, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y el par de cebadores específicos de los microorganismos que hay que detectar, en un medio tamponado.

25 Se han realizado 40 ciclos de amplificación.

A continuación se han pipeteado 15 µl de ADN amplificados, se han añadido a esta preparación 3 µl de azul de bromofenol y se ha depositado esta preparación dentro de un pocillo en el interior de un gel de agarosa.

30 Se ha aplicado una corriente con el fin de que los fragmentos de ADN amplificados migren en función de su peso molecular (PM).

35 En la figura 3A se presenta una foto de un gel de agarosa después de la migración.

II.3 Identificación de Escherichia coli y de Staphylococcus epidermidis presentes en unas muestras de sangre de sangre completa

40 Se han tratado 5 ml de sangre completa de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo I.2 en el cual la membrana de filtración era de fluoruro de polivinilideno con 25 mm de diámetro y cuyos poros presentan un diámetro de aproximadamente 0,65 µm. Se han utilizado 8 ml de agua osmotizada filtrada por medio de un filtro cuyos poros presentan un diámetro de aproximadamente 0,22 µm para lavar la membrana de filtración.

45 Después de la extracción del ADN de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo II.1, se han realizado unas reacciones en cadena de la polimerasa (RCP) en tiempo real de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo II.2.1, utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de Escherichia coli y de Staphylococcus epidermidis.

50 La figura 1 (A y B) muestra los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de Escherichia coli.

La figura 2 (A y B) muestra los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa utilizando unas sondas fluorescentes y un par de cebadores específicos de Staphylococcus epidermidis.

55 Estos resultados muestran que el procedimiento de preparación de la muestra de sangre de sangre completa de acuerdo con la invención permite obtener unas muestras en las que se pueden identificar y cuantificar los microorganismos de manera específica y reproducible mediante unas técnicas de reacción en cadena de la polimerasa.

60 II. 4 Identificación de Escherichia coli presente en unas muestras de sangre de sangre completa

65 Se han tratado 5 ml de sangre completa de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo I.2 en el cual la membrana de filtración era de fluoruro de polivinilideno de 25 mm de diámetro y cuyos poros presentan un diámetro de aproximadamente 0,65 µm. Se han utilizado 8 ml de agua osmotizada filtrada por medio de un filtro cuyos poros presentan un diámetro de aproximadamente 0,22 µm para lavar la membrana de filtración.

Después de la extracción del ADN de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo II.1, se han realizado unas diluciones del extracto de ADN en agua pura para biología molecular para probar la sensibilidad de las RCP: dilución del extracto de ADN de 1/100 a 1/50.000.

5 A continuación se han realizado unas reacciones en cadena de la polimerasa (RCP) cuantitativas en tiempo real de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo II.2.1 y en punto final de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo II.2.2. Se han utilizado una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de *Escherichia coli*.

10 La figura 3A muestra una foto de un gel de agarosa después de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) clásica y migración utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de *Escherichia coli*.

La figura 3B muestra los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa (RCP) cuantitativas en tiempo real utilizando unas sondas fluorescentes y un par de cebadores específicos de *Escherichia coli*.

15 Estos resultados muestran que el procedimiento de preparación de la muestra de sangre procedente de sangre completa de acuerdo con la invención permite obtener unas muestras en las que los microorganismos se pueden identificar y cuantificar de manera específica, reproducible y con un cierta sensibilidad mediante unas técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o en punto final.

20 II.5 Identificación de *Escherichia coli*, de *Staphylococcus epidermidis* y de *Klebsiella oxytoca* presente en unas muestras de sangre de hemocultivo

25 Se han preparado unas muestras de sangre de hemocultivo de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo I.1 en el cual la membrana de filtración era de fluoruro de polividileno de 25 mm de diámetro y cuyo diámetro de poros es de aproximadamente 0,65 µm. Se han utilizado 3 ml de agua osmotizada para lavar la membrana de filtración.

30 Después de la extracción del ADN de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo II.1, se han realizado unas reacciones en cadena de la polimerasa (RCP) cuantitativas en tiempo real de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo II.2.1 utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de *Escherichia coli*, de *Staphylococcus epidermidis* y de *Klebsiella oxytoca*. Los resultados se presentan en la figura 4.

35 Estos resultados muestran que el procedimiento de preparación de la muestra de sangre procedente de hemocultivo de acuerdo con la invención permite obtener unas muestras en las que los microorganismos se pueden identificar y cuantificar de manera específica y reproducible mediante unas técnicas de reacción en cadena de la polimerasa.

II.6 Identificación de *Escherichia coli* y de *Staphylococcus epidermidis* presentes en unas muestras de sangre de sangre completa extraída con diferentes anticoagulantes

40 Se han tratado 5 ml de sangre completa extraída de unos tubos que contienen un anticoagulante sanguíneo de tipo EDTA tripotásico, citrato de sodio o heparina (heparina de litio) de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo I.2 en el cual la membrana de filtración era de fluoruro de polivinilideno de 25 mm de diámetro y cuyos poros presentan un diámetro de aproximadamente 0,65 µm. Se han utilizado 8 ml de agua osmotizada filtrada por medio de un filtro cuyos poros presentan un diámetro de aproximadamente 0,22 µm para lavar la membrana de filtración.

45 Después de la extracción del ADN de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo II.1, se han realizado unas reacciones en cadena de la polimerasa (RCP) en tiempo real de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo II.2.1, utilizando una sonda fluorescente y un par de cebadores específicos de *Escherichia coli* y de *Staphylococcus epidermidis*.

50 Las figuras 5A y 5B muestran los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa utilizando unas sondas fluorescentes y un par de cebadores específicos de *Escherichia coli* para ADN bacteriano procedente de sangre completa extraída con EDTA tripotásico (figura 5A) y con citrato de sodio (figura 5b).

55 La figura 5C muestra los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa utilizando unas sondas fluorescentes y un par de cebadores específicos de *Staphylococcus epidermidis* para ADN bacteriano procedente de sangre completa extraída con heparina (figura 5C).

60 Estos resultados muestran que el procedimiento de preparación de la muestra de sangre procedente de sangre completa extraída con diferentes anticoagulantes de acuerdo con la invención permite obtener unas muestras en las que se pueden identificar y cuantificar los microorganismos de manera específica y reproducible mediante unas técnicas de reacción en cadena de la polimerasa.

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de extracción de ADN de microorganismos presentes en una muestra de sangre que comprende las siguientes etapas:
- 5
- i) la filtración de una muestra de sangre a través de una membrana de filtración cuyos poros presentan un diámetro que va de 0,01 μm a 50 μm , en particular de 0,1 μm a 10 μm , y de manera más particular de 0,2 μm a 1 μm ;
 - 10 ii) el lavado de dicha membrana de filtración, en el cual dicho lavado lava los glóbulos rojos de la muestra de sangre; y
 - iii) la extracción de los ácidos desoxirribonucleicos de los microorganismos eventualmente presentes en dicha membrana de filtración.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende, además, la siguiente etapa:
- 15
- iv) la identificación de los microorganismos, en particular de las bacterias, de los virus, de los protozoos y/o de los hongos eventualmente presentes en dicha muestra de sangre.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** la etapa iv) comprende el uso de una técnica de biología molecular que utiliza una actividad de tipo polimerasa seleccionada dentro del grupo que comprende la reacción en cadena de la polimerasa en punto final, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, la reacción en cadena de la polimerasa multiplex, la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa, la reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
- 20
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** comprende, además, la siguiente etapa:
- 25
- v) la identificación de al menos un gen de resistencia a un antibiótico en al menos un microorganismo presente en dicha muestra de sangre.
- 30
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** la etapa v) comprende el uso de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** comprende, además, la siguiente etapa:
- 35
- vi) la determinación de la cantidad de microorganismos, en particular de bacterias, virus, protozoos y/u hongos presentes en dicha muestra de sangre.
- 40
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** dicha membrana de filtración se selecciona dentro del grupo que comprende las membranas de fluoruro de polivinilideno, de poliéster, de nailon, de polipropileno, de policarbonato y de polietersulfona, en particular de fluoruro de polivinilideno.
- 45
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** dicha membrana de filtración no es a base de celulosa.
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** dicha muestra de sangre se selecciona dentro del grupo que comprende:
- 50
- una muestra de sangre de sangre completa; y
 - una muestra de sangre de hemocultivo.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** comprende, de forma previa a la etapa i), las siguientes etapas:
- 55
- a) la adición a la sangre completa o al hemocultivo de una solución de aglutinación de los glóbulos rojos y/o de una solución de agregación plaquetaria; y
 - 60 b) la filtración de la preparación obtenida en la etapa a) a través de un filtro cuyos poros presentan un diámetro que va de 2 μm a 50 μm , en particular que va de 10 μm a 25 μm , y de manera más particular de 17 μm .
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** dicha solución de aglutinación comprende al menos un agente de aglutinación seleccionado dentro del grupo que comprende las lectinas, la polietilenimina, la polivinilpirrolidona, las gelatinas, los dextranos y los polietileno glicoles, en particular las lectinas de *lens culinaris*.
- 65

12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado por que** dicha solución de agregación plaquetaria comprende al menos un agente de agregación plaquetaria seleccionado dentro del grupo que comprende los anticuerpos específicos de un antígeno plaquetario, la trombina, la tripsina, el colágeno, el tromboxano A₂, el factor de activación plaquetaria, la adrenalina, el ácido araquidónico, la serotonina y la epinefrina, en particular los anticuerpos específicos de un antígeno plaquetario y el colágeno.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

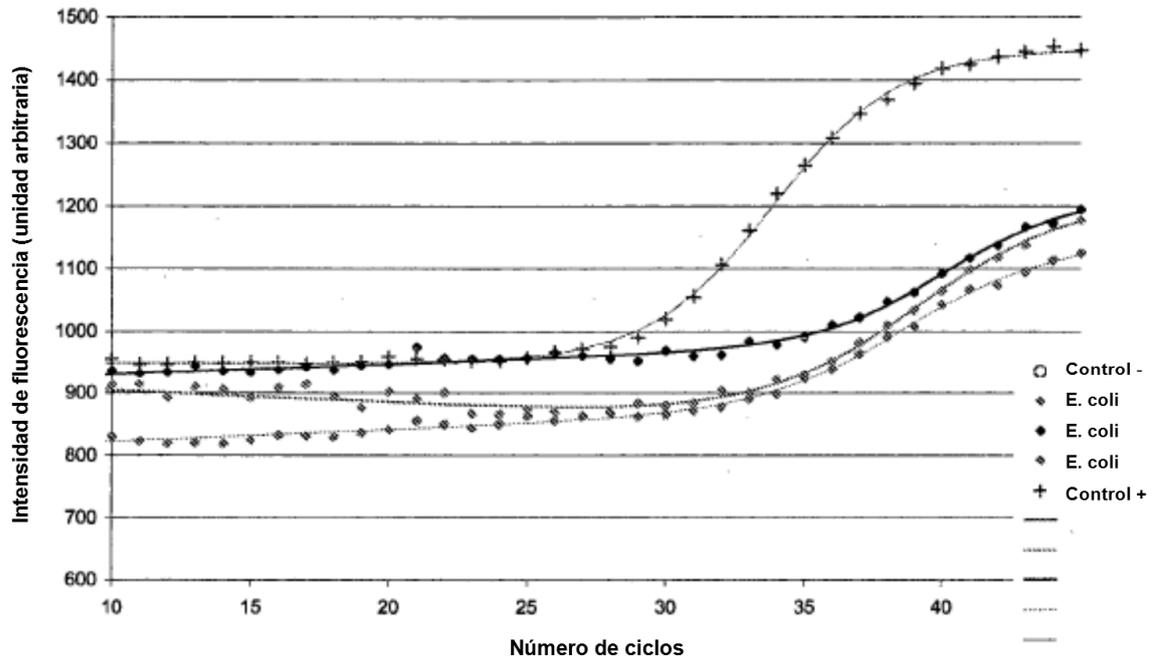


FIGURA 1A

| | Control - | E. coli | E. coli | E. coli | Control + |
|----------|-----------|---------|---------|---------|-----------|
| Ct | 0,0 | 35,3 | 37,1 | 35,2 | 30,9 |
| amplitud | -322,2 | 385,7 | 223,0 | 253,0 | 499,6 |

FIGURA 1B

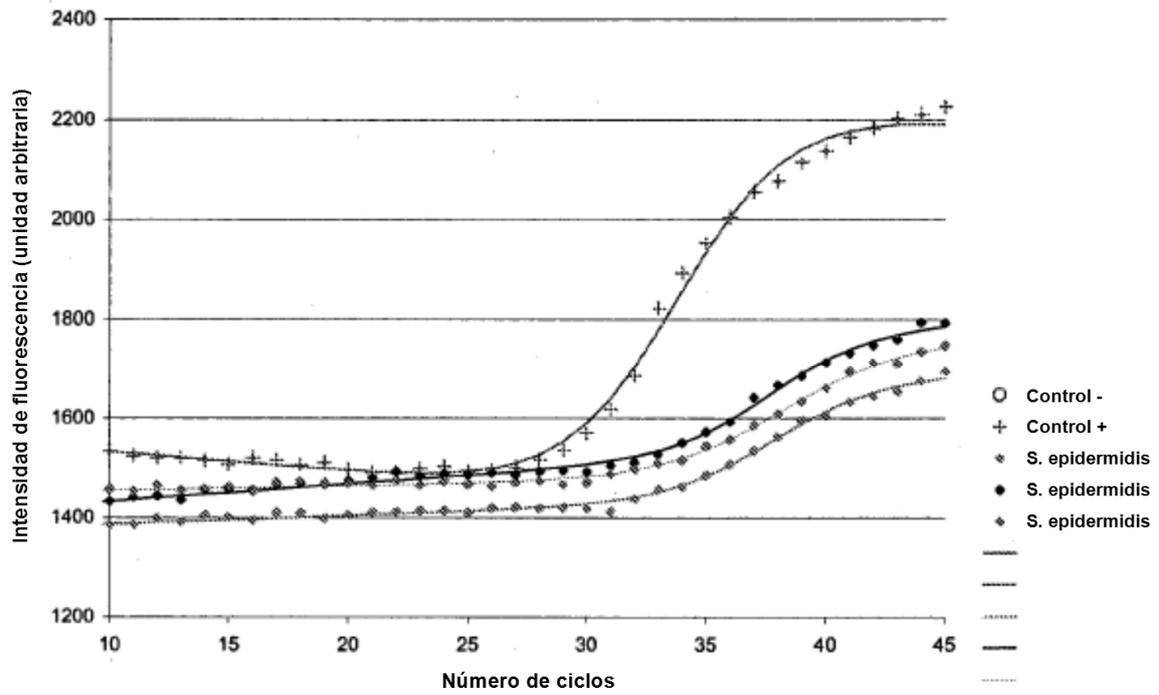


FIGURA 2A

| | Control - | S. epidermidis | S. epidermidis | S. epidermidis | Control + |
|----------|-----------|----------------|----------------|----------------|-----------|
| Ct | 0,0 | 34,9 | 35,0 | 35,0 | 30,3 |
| amplitud | 0 | 242,3 | 237,6 | 274,0 | 779,0 |

FIGURA 2B

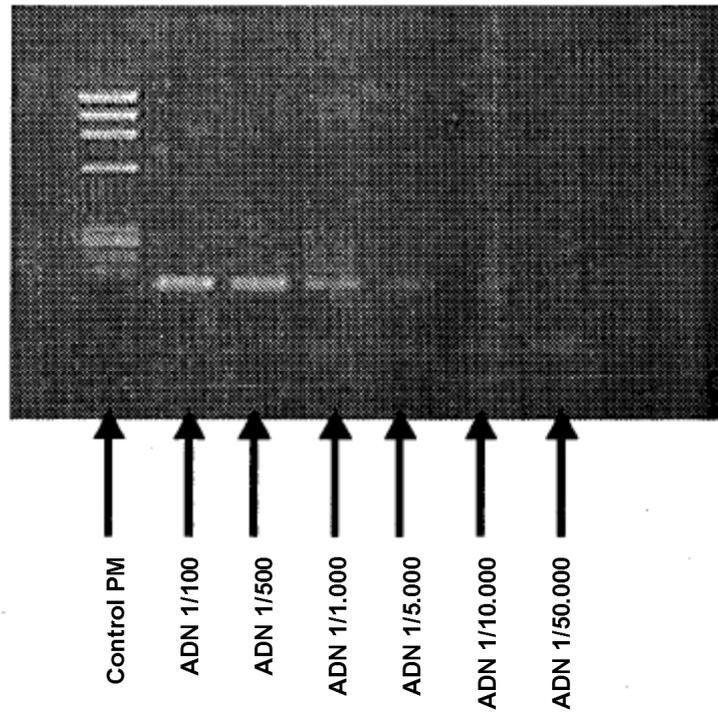


FIGURA 3A

| | Control - | Control + | ADN 1/100 | ADN 1/500 | ADN 1/1.000 | ADN 1/5.000 | ADN 1/10.000 | ADN 1/50.000 |
|----------|-----------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ct | 0,0 | 29,3 | 27,47 | 31,40 | 33,60 | 35,50 | 0 | 0 |
| amplitud | 42 | 546 | 372,4 | 334,7 | 159,5 | 162,1 | 20,4 | 1,63 |

FIGURA 3B

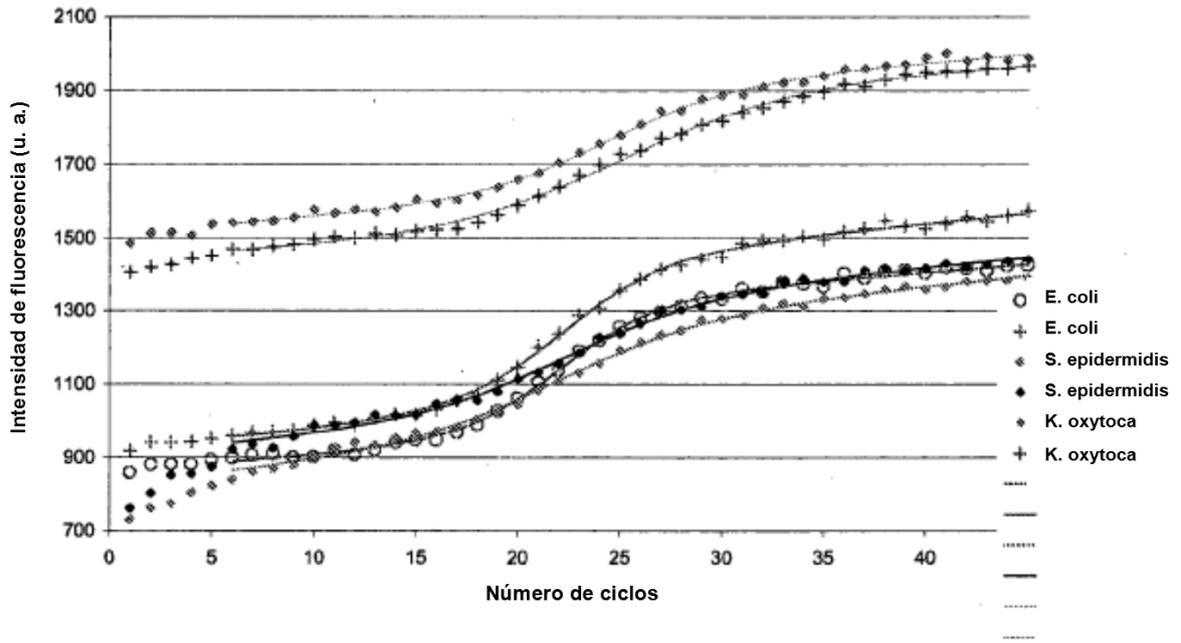


FIGURA 4

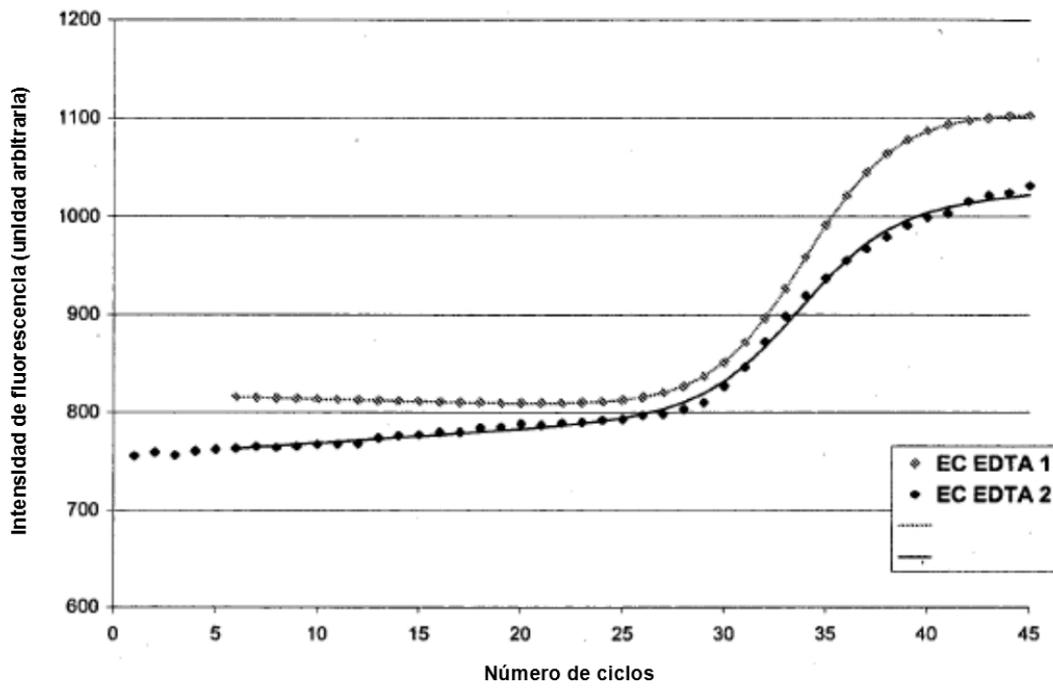


FIGURA 5A

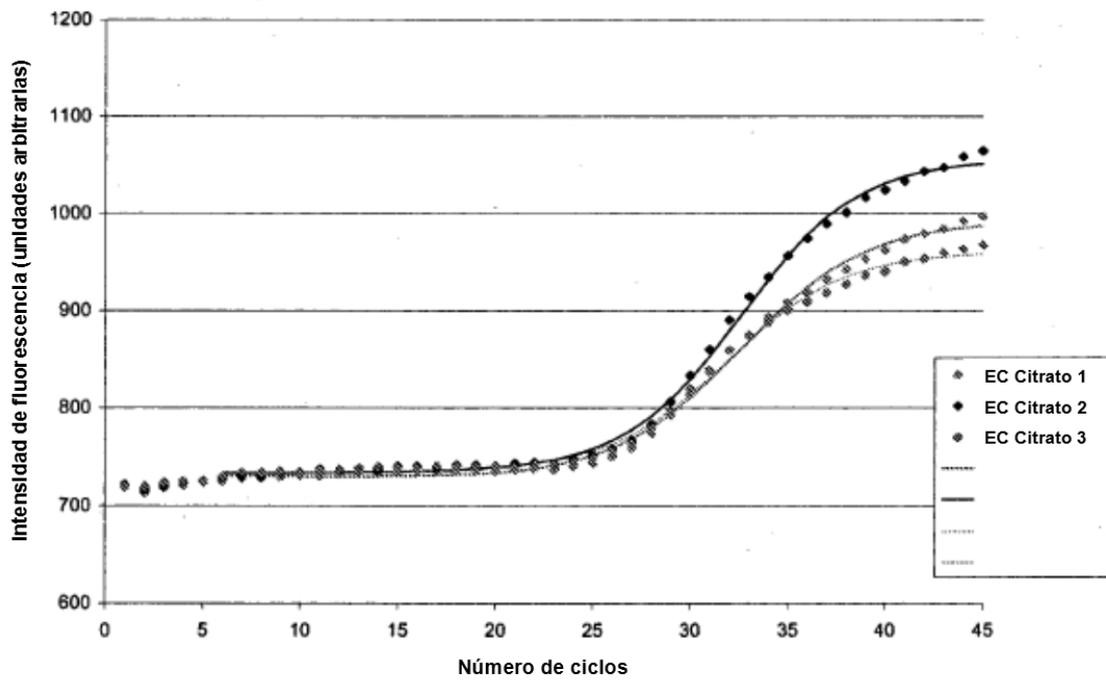


FIGURA 5B

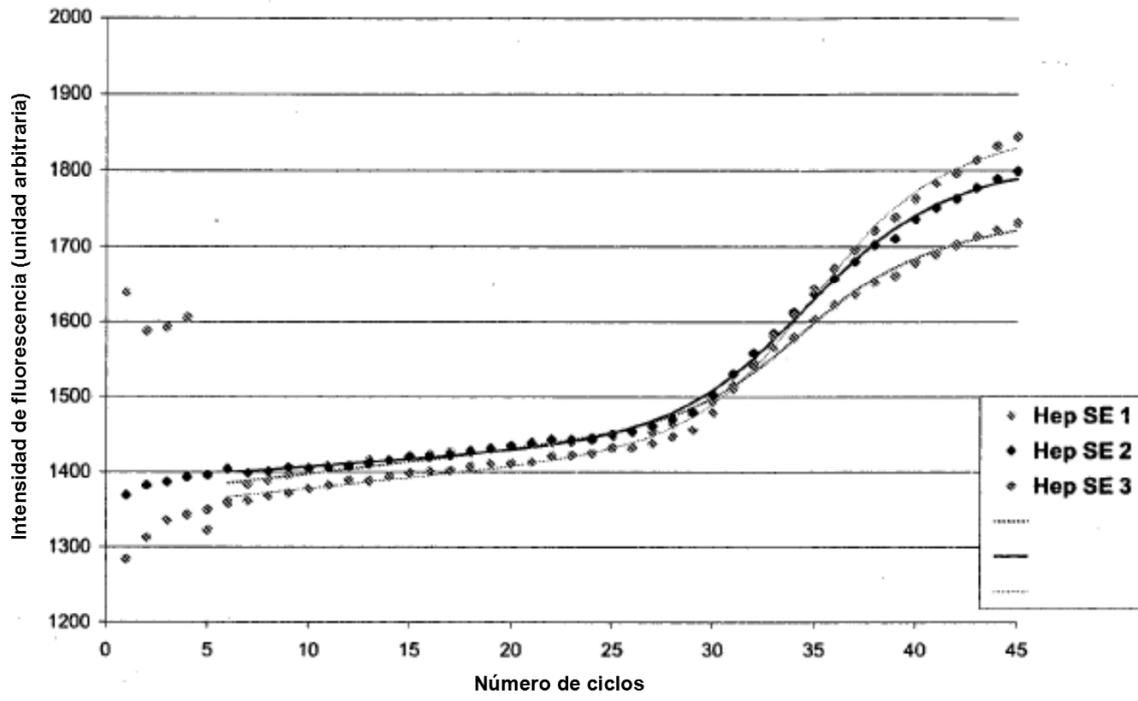


FIGURA 5C