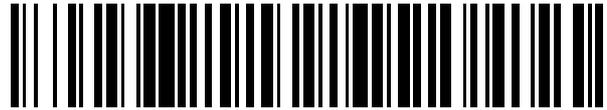


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 240**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/02** (2006.01)

**C12N 11/02** (2006.01)

**C12N 11/14** (2006.01)

**A23L 3/00** (2006.01)

**A61L 2/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2006 E 06001034 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1681345**

54 Título: **Procedimiento y kit para la esterilización de líquidos que contienen microorganismos**

30 Prioridad:

**18.01.2005 DE 102005002342**

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

**15.04.2014**

73 Titular/es:

**GEN-INSTITUT FÜR ANGEWANDTE  
LABORANALYSEN GMBH (50.0%)**

**Heuserweg 13-15**

**53842 Troisdorf-Spich, DE y**

**BITBURGER BRAUEREI TH.SIMON GMBH  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHÖNLING, JUTTA y**

**MÜCHER, GABRIELE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 455 240 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 y kit para la esterilización de líquidos que contienen microorganismos

5 La invención se refiere a la utilización de un procedimiento para la separación no específica y el análisis de microorganismos a partir de grandes volúmenes de líquidos. Por ello, por primera vez resulta posible esterilizar grandes volúmenes de líquidos a escala de litros. Además, el procedimiento posibilita la analítica de los microorganismos aislados. La utilización conforme a la invención del procedimiento es especialmente adecuada para la separación no específica de bacterias, levaduras, virus, hongos y esporas a partir de grandes volúmenes de líquidos.

10 Para la esterilización de líquidos, por lo regular se lleva a cabo un tratamiento a presión y elevada temperatura, denominado de autoclave, o una filtración estéril. El primer tratamiento lleva ciertamente a la muerte de los microorganismos, pero no a la separación del ADN, el cual en subsiguientes aplicaciones se puede hacer notar de forma a inducir errores, por ejemplo en el PCR, mientras que la filtración estéril solo es aplicable en soluciones acuosas de volumen limitado.

15 Para el aislamiento directo de microorganismos solo se disponen hasta el momento de procedimientos para cantidades mínimas de líquido, a escala de mililitros, (documento DE 101 49 803 A1), mientras que para cantidades grandes, a escala de litros, no se dispone de ninguno o solo de procedimientos de gran complejidad en cuanto a tiempo, dinero y aparatos. Como método estándar en el caso de soluciones filtrables de gran volumen sirve una filtración de membrana costosa en tiempo (documento WO/0152968). Los filtros de membrana empleados rutinariamente para bacterias (0,45 µm) son todavía permeables para pequeñas bacterias y virus y, por consiguiente, tampoco seguros. Para líquidos no filtrables no se dispone momentáneamente de ningún método de aislamiento fiable. El aislamiento de virus a partir de grandes volúmenes representa aún hoy en día un problema muy grande. Los filtros deben tener un tamaño de muestras tan pequeño, que las soluciones acuosas taponan muy deprisa los filtros.

25 En el caso de volúmenes pequeños se emplea por el momento la centrifugación. La toma de muestras se reduce aquí a un pequeño volumen de muestra, en el cual eventualmente no se captan pequeños componentes microbianos y virales. Por consiguiente, el límite de detección se sitúa muy por encima del valor deseado de 1 germen por litro. En los dos casos tiene lugar un enriquecimiento de varios días asociado a complejos ensayos fisiológicos y de enriquecimiento de cultivos, que exigen tiempo. Una posible solución para eludir la centrifugación se encuentra en la patente DE 101 49 803 A1, haciendo que bacterias en medios de cultivo de pequeño volumen se unan a polímeros líquidos magnetizados.

30 En la solicitud de patente WO 98/51693 A se describe un aislamiento de células (por ejemplo células bacterianas) que se lleva a cabo a escala de laboratorio a partir de pequeños volúmenes de líquido (del orden de mililitros), en el cual el aislamiento tiene lugar por la unión no específica de las células a un material de soporte sólido y, después del aislamiento, las células se lisan para examinar su ADN.

35 La patente FR-A-2 440 402 da a conocer un procedimiento a escala de laboratorio para la esterilización de líquidos, en el cual los microorganismos se aíslan de los líquidos ligándolos a materiales de soporte sólidos.

En el documento WO 02/34075 A1 se da a conocer un procedimiento para la esterilización de grandes volúmenes de líquido calentando primero el líquido en este procedimiento a más de 60°C y aplicando a continuación un campo eléctrico.

40 Resumiendo, las desventajas de los procedimientos de hoy en día son:

- ninguna posibilidad de un aislamiento directo a partir de grandes volúmenes de líquido,
- enriquecimiento de varios días en diversos medios selectivos,
- filtraciones de membrana costosas en tiempo e inseguras,
- pequeño volumen de muestra asociado al riesgo de no detectar pequeñas concentraciones,
- 45 • polímeros magnetizados de gran coste, especialmente inadecuados para grandes volúmenes,
- ninguna solución practicable para el aislamiento de virus sin enriquecimiento,
- ningún procedimiento para la esterilización mediante el empobrecimiento de microorganismos a gran escala y posterior liberación del ADN de la solución.

50 A partir de esto, era objeto de la presente invención poner a disposición un procedimiento que hiciera posible una separación no específica y un análisis de los microorganismos a partir de cantidades de líquido en grandes

volúmenes, que garantizara a pesar de ello una manipulación sencilla y rápida para hacer posible conducir el procedimiento de forma rentable.

Este problema se soluciona mediante la utilización del procedimiento con las características de la reivindicación 1. Las demás reivindicaciones dependientes muestran perfeccionamientos ventajosos.

- 5 Conforme a la invención se pone a disposición la utilización de un procedimiento para la separación no específica y el análisis de microorganismos a partir de grandes volúmenes de líquidos. Éste se basa esencialmente en las siguientes etapas:
- 10 a) En el líquido se distribuye homogéneamente un material de soporte a base de polímeros, vidrio o cerámica, cuya superficie fue funcionalizada químicamente por unión de grupos químicos funcionales para la adsorción no específica de los microorganismos contenidos en el líquido. El valor del pH del líquido se ajusta en este caso en función del tipo de microorganismos, de tal modo que se garantice una adsorción máxima de los microorganismos al material de soporte.
- 15 b) El líquido provisto del material de soporte se agita a una temperatura en el intervalo de 10 a 37°C, hasta que finalice la quimisorción de los microorganismos en virtud de interacciones covalentes y/o iónicas en el material de soporte.
- c) A continuación tiene lugar la separación del material de soporte, cargado de microorganismos, del líquido.
- d) Eventualmente tiene lugar un enriquecimiento del material de soporte cargado de microorganismos en un medio nutriente adecuado.
- 20 e) Regeneración por lisis del material de soporte cargado de microorganismos y aislamiento simultáneo de una solución que contiene ADN.
- f) Análisis de la solución que contiene ADN.

25 Con la utilización del procedimiento aquí descrito se consigue por primera vez ligar microorganismos y virus de forma no específica a partículas de polímeros en forma de cuerpos sólidos, funcionalizados en superficie, a partir de grandes volúmenes de líquidos. Por ello, estos líquidos por una parte se esterilizan (liberación del ADN) y, por otra, los microorganismos aislados se hacen accesibles a una detección rápida. La utilización del método hace posible detectar microorganismos ya en estado incipiente de su desarrollo, en concentraciones extremadamente bajas, de manera muy rápida y segura. La utilización del procedimiento es barata, sencilla y de múltiples posibilidades de aplicación.

30 La adición del material de soporte se efectúa a una cantidad definida del líquido. Para una unión eficiente de los microorganismos al material de soporte tiene que existir un valor definido del pH. En caso necesario, el valor del pH se ajusta antes con determinadas soluciones tampón. Para el procedimiento conforme a la invención es decisivo un valor definido del pH. Para una unión eficiente de los microorganismos, las soluciones deben cumplir determinadas exigencias y, en caso de no cumplirse, éstas deben ser modificadas. La concentración del material de soporte depende en este caso del número y tipo de microorganismos, así como del volumen de líquido. Éstos se presentan en un intervalo de concentración, en el cual esté garantizada una suficiente unión de los microorganismos al material de soporte.

35 La agitación del líquido y del material de soporte se efectúa a una temperatura definida en el intervalo de 10 a 37°C, y con movimientos definidos. Por elección de temperaturas de incubación y tiempos de incubación adecuados, durante la fase de unión también se puede llevar a cabo un breve enriquecimiento previo de los microorganismos. Por ello se aumenta la sensibilidad para algunos microorganismos.

40 Para la separación del líquido de la mezcla de microorganismos-material de soporte se dispone de los procedimientos de separación conocidos del estado de la técnica. La única limitación para ello consiste en que, por una parte los microorganismos durante la separación permanezcan retenidos en el material de soporte, se separen del líquido los posibles inhibidores y no se pierda material de soporte alguno.

45 Como materiales de soporte encuentran aplicación polímeros, vidrio o cerámica.

Preferentemente, el material de soporte se emplea en forma de un polvo, un granulado, una lámina, una membrana, un cuerpo sinterizado o de una espuma. Preferentemente, el material de soporte puede estar funcionalizado en este caso en forma hidrófila o hidrófuga. La funcionalización se puede llevar a cabo preferentemente de manera que los grupos funcionales se unan al material de soporte directamente o a través de un espaciador.

50 Si la quimisorción se basa en una interacción química, entonces los grupos funcionales se seleccionan preferentemente del grupo constituido por grupos amina, carboxilo, carboxilato, ácido sulfónico, sulfonato, fosfato y proteínas.

Si por el contrario la quimisorción se basa en una interacción covalente, entonces los grupos funcionales se seleccionan preferentemente del grupo constituido por ésteres activos, amidas de ácido, epóxidos, halogenuros, halogenuros de ácido y enlaces múltiples C-C.

5 El material de soporte funcionalizado puede presentar en este caso carácter neutro, catiónico o también aniónico. Esto se puede fijar arbitrariamente en función del microorganismo a aislar. La puesta en contacto del material de soporte con el líquido tiene lugar preferentemente por una dispersión del material de soporte en un medio líquido. Pero según otra variante preferida, el material de soporte se puede presentar también en forma de un cuerpo poroso, a través de cuyos poros fluye entonces el medio líquido.

10 La separación del material de soporte del medio líquido tiene lugar preferentemente mediante filtración, sedimentación o tamizado.

El material de soporte separado y cargado de microorganismos, preferentemente en una etapa adicional, se puede someter a un enriquecimiento previo en medios nutrientes adecuados.

15 La utilización del procedimiento conforme a la invención prevé que la mezcla de material de soporte y microorganismos se someta, a valores del pH definidos, a una lisis directa con diferentes tampones de lisis. La elección del tampón de lisis depende en este caso de los microorganismos a aislar. Para ello tiene lugar una adición de tampones de lisis y eventualmente enzimas a la mezcla de material de soporte y microorganismos separada del líquido. A continuación, tiene lugar una incubación de la mezcla con tampones de lisis y eventualmente enzimas. La temperatura de incubación adecuada y la elección de las enzimas para la lisis depende del tipo de microorganismo a aislar o de los microorganismos a aislar. La elección de los parámetros permite un mayor rendimiento en ADN. A continuación, la solución que contiene ADN se separa entonces del material de soporte, para lo cual también aquí se pueden aplicar los procedimientos de separación conocidos en el estado de la técnica.

20 Este sistema permite al usuario aislar microorganismos y virus directamente de los líquidos a examinar, y enriquecerlos. Por ello, por una parte se puede esterilizar el líquido y, por otra parte el ADN de los microorganismos aislados se puede extraer por medio de los tampones de lisis y enzimas suministrados conjuntamente, y las especies se pueden identificar con posteriores métodos biomoleculares ya establecidos.

25 Con la utilización del procedimiento conforme a la invención se pueden separar de forma no específica microorganismos arbitrarios a partir de líquidos en gran volumen, especialmente bacterias, levaduras, virus, hongos y esporas. En este caso, los campos de aplicación no son fundamentalmente limitados, sino que afectan a todos los sectores en los que juegan un papel los microorganismos. A ellos pertenecen, por ejemplo, los controles de calidad y ensayos de calidad microbiológicos, especialmente en la producción de bebidas y líquidos, en la preparación de medios de cultivo para aplicaciones médicas y de procesamiento de alimentos, en la preparación de cultivos celulares, en la producción de medicamentos, en la elaboración de las aguas en instalaciones depuradoras y piscinas, y en el sector del agua potable.

30 Con ayuda del siguiente ejemplo se debe ilustrar con más detalle la utilización del procedimiento conforme a la invención, sin pretender limitarla a la forma de ejecución especial aquí citada.

#### **Ejemplo**

35 Un litro de cerveza se inocula con una determinada cantidad de gérmenes de *Lactobacillus brevis* y se trata con 500 mg de material de soporte funcionalizado en superficie. El material de soporte se ha funcionalizado en este caso con grupos de polietilenimina. La cerveza se agita a continuación con un agitador superior durante 2 h a 29°C. A continuación, el material de soporte cargado se separa por tamizado mediante múltiples lavados con agua estéril (pH 5,0) en un sistema de aparatos de tamizado especialmente construido.

40 El material de soporte así cargado con los microorganismos se puede extraer del tamiz por disolución y, para el breve enriquecimiento del cultivo, se lleva a un medio de cultivo, por ejemplo un medio MRS, y durante 16 a 24 h se incuba a 29°C bajo agitación. Para el aislamiento directo del ADN bacteriano, se lisan a continuación las bacterias ligadas sobre el material de soporte y el ADN se aísla con métodos habituales.

**REIVINDICACIONES**

1. Utilización de un procedimiento para la separación no específica y el análisis de microorganismos a partir de grandes volúmenes de líquidos, en el cual
- 5 a) en el líquido se distribuye homogéneamente un material de soporte a base de polímeros, vidrio o cerámica, cuya superficie se funcionalizó químicamente por unión de grupos químicos funcionales para la adsorción no específica de los microorganismos contenidos en el líquido, fijándose en este caso el valor del pH del líquido en función del tipo de microorganismos,
- 10 b) agitación del líquido y del material de soporte a una temperatura en el intervalo de 10 a 37°C, que posibilita una quimisorción de los microorganismos en virtud de interacciones covalentes y/o iónicas en el material de soporte,
- c) separación del líquido del material de soporte, cargado con los microorganismos,
- d) eventualmente, enriquecimiento del material de soporte cargado con microorganismos en un medio nutriente adecuado,
- 15 e) regeneración por lisis del material de soporte cargado con microorganismos y al mismo tiempo aislamiento de una solución que contiene ADN,
- f) análisis de la solución que contiene ADN.
2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada por que** el material de soporte se emplea en forma de un polvo, un granulado, una lámina, una membrana, un cuerpo sinterizado o una espuma.
- 20 3. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** el material de soporte se funcionaliza en forma hidrófila o hidrófuga.
4. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** los grupos funcionales están unidos al material de soporte directamente o a través de un espaciador.
- 25 5. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la adsorción se basa en una interacción iónica, y los grupos funcionales se seleccionan del grupo constituido por grupos amina, carboxilo, carboxilato, ácido sulfónico, sulfonato, fosfato y proteínas.
6. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la adsorción se basa en una interacción covalente, y los grupos funcionales se seleccionan del grupo constituido por ésteres activos, amidas de ácido, epóxidos, halogenuros, halogenuros de ácido y enlaces múltiples C-C.
- 30 7. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** el material de soporte funcionalizado posee un carácter neutro, catiónico o aniónico.
8. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** el material de soporte se dispersa en el medio líquido.
9. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** el material de soporte se presenta en forma de un cuerpo poroso y el medio líquido fluye a través de sus poros.
- 35 10. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la separación del material de soporte del medio líquido tiene lugar mediante filtración, sedimentación y/o tamizado.
11. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la lisis tiene lugar con un tampón de lisis y/o enzimas.
- 40 12. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** los microorganismos aislados se siguen tratando, especialmente se analizan.
13. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** los microorganismos se seleccionan del grupo constituido por bacterias, levaduras, virus, hongos y esporas.