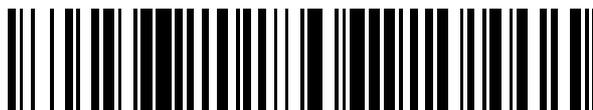


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 968**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2010 E 10807664 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2510123**

54 Título: **Lisis selectiva de células**

30 Prioridad:

08.12.2009 EP 09178363

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

20.10.2014

73 Titular/es:

**BIOCARTIS NV (100.0%)
Generaal De Wittelaan 11 B3
2800 Mechelen, BE**

72 Inventor/es:

**VAN MEERBERGEN, BART EDWARD GUSTA
JOZEF;
PICIU, OANA MIHAELA;
GILL, RON;
SCHMIDT, KRISTIANE ANNE;
NEERKEN, SIEGLINDE;
PONJEE, MARC WILHELMUS GIJSBERT;
UNAY, ZEYNEP SEFLEK;
PENTERMAN, ROEL y
VAN DE WIEL, PAUL ARNOLD**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 509 968 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

Lisis selectiva de células.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a la lisis de células eucariotas, en particular células animales, tales como células sanguíneas. La presente invención se refiere adicionalmente a la detección de bajas concentraciones de microorganismos tales como bacterias en muestras con altas concentraciones de otras células.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El diagnóstico molecular tiene como objetivo la detección rápida de cantidades mínimas de patógenos (típicamente bacterias) en muestras tal como sangre. Sin embargo, la sangre es una matriz compleja y comprende glóbulos blancos (leucocitos) para el sistema inmune adaptativo, glóbulos rojos (eritrocitos) para el transporte de oxígeno, y plaquetas (trombocitos) para la cicatrización de heridas. Esto complica la detección directa de patógenos en muestras tal como
15 sangre completa, que contienen una gran cantidad de material celular.

Los procedimientos de detección clásicos comprenden el crecimiento de bacterias en medios selectivos y/o medios con indicadores. Típicamente, dichos ensayos requieren una etapa de cultivo de al menos 1 ó 2 días antes de que pueda tener lugar la identificación.
20

Para los procedimientos basados en PCR, la cantidad de bacterias en una muestra de sangre fresca es en teoría lo suficientemente alta para detectarse sin un cultivo adicional de las bacterias presentes en dicha muestra. Sin embargo, para permitir una detección temprana de cantidades mínimas de bacterias, se requieren grandes volúmenes de sangre. La gran cantidad de ADN especialmente en los glóbulos blancos, aumenta dramáticamente los antecedentes en los procedimientos de detección basada en ADN. Además, la presencia de hemo procedente de la hemoglobina disminuye fuertemente la actividad de la ADN polimerasa. Un microlitro de sangre humana contiene aproximadamente de 4.000 a 11.000 glóbulos blancos y
25 aproximadamente de 150.000 a 400.000 plaquetas. La concentración de ADN en sangre está entre 30 y 60 µl/ml. Es extremadamente difícil detectar en un volumen de 10ml de sangre completa la presencia de aproximadamente 10 a 100.000 de una especie bacteriana.
30

Las elevadas cantidades de ADN de los glóbulos blancos pueden dar lugar a productos de PCR no relevantes, o pueden eliminar los cebadores diseñados para la detección de ADN bacteriano. Esto requiere una minuciosa purificación de ADN y la separación de ADN mamífero antes de que el ADN bacteriano pueda detectarse a través de PCR u otros procedimientos.
35

Además de interferir con la propia reacción de PCR, la cantidad de ADN mamífero aumenta la viscosidad de una muestra. Además, las proteínas y las membranas de las células mamíferas sometidas a lisis forman complejos que impiden la filtración de una muestra. Esto es particularmente un problema para los dispositivos miniaturizados. La dilución y la adición del ya gran volumen de muestra da como resultado largas etapas de manipulación inaceptables.
40

Por los motivos anteriores, se requieren en consecuencia procedimientos para extraer ADN humano de una muestra de sangre.
45

Se conocen procedimientos para ensayar específicamente el ADN bacteriano en presencia de ADN mamífero. Looxter™, de la empresa SIRSLab, usa un procedimiento para enriquecer el ADN metilado de una muestra. Puesto que el ADN bacteriano está fuertemente metilado, este
50

5 enfoque da como resultado un enriquecimiento del ADN bacteriano. Molysis™, de la empresa Molzym, usa agentes caotrópicos y detergentes para lisar selectivamente células mamíferas. Esta etapa de lisis se sigue de una digestión con una ADNasa que no se ve afectada por este agente caotrópico/detergente. Los enfoques alternativos, tales como los comercializados por Roche (Septifast™) se basan en pares de cebadores de PCR que están diseñados específicamente para impedir la unión inespecífica a ADN humano y la amplificación de ADN humano.

10 El documento US 6.803.208 describe un procedimiento en el que una suspensión altamente diluida de plaquetas sanguíneas dopada con bacterias se lisa a 37 °C durante 15 minutos, después de lo cual es posible filtrar una pequeña cantidad de muestra lisada sobre un filtro de 0,4 µm para realizar una inspección visual de las bacterias que están retenidas en el filtro. Sin embargo, este procedimiento no permite procesar grandes volúmenes de muestra a temperatura ambiente.

15 Sullivan N M y col. ("Practical aerobic membrane filtration blood culture technique: development of procedure", Journal of Clinical Microbiology, vol. 1, N° 1, enero de 1975) desvelan diversos tampones para la lisis selectiva de células sanguíneas para detectar microorganismos en la sangre. El documento WO 00/72970 A1 (Cepheid, 7 de diciembre de 2000) desvela un dispositivo de cartucho para la detección de ADN.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención se define en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas.

25 Un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la lisis selectiva de células animales, en una muestra que contiene, o se sospecha que contiene, un microorganismo. Este procedimiento comprende las etapas de proporcionar una muestra con células eucariotas, en particular, células animales, que contiene, o se sospecha que contiene un microorganismo, añadir un detergente no iónico y un tampón a la muestra para obtener una solución con un pH de aproximadamente 9,5 o más, e incubar la solución durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo para lisar las células animales, por ejemplo, entre 30 segundos y 10 minutos, más preferiblemente entre 2 y 6 minutos. La lisis puede realizarse en realizaciones particulares entre 15 y 30 °C, más preferiblemente aproximadamente la temperatura ambiente.

35 En realizaciones particulares, la muestra es una muestra de sangre de mamífero, tal como sangre completa.

En otras realizaciones particulares, el microorganismo es una bacteria u hongo.

40 De acuerdo con realizaciones particulares, la relación entre el volumen de detergente añadido y de tampón añadido y el volumen de muestra está entre 2/1 y 1/10.

45 En realizaciones particulares, el detergente no iónico se selecciona entre el grupo que comprende Nonidet, Brij, Tween, Igepal, triton reducido, octilglucósido, colato y Triton. Ejemplos más preferidos son Tritón X-100, Nonidet P40, desoxicolato sódico y/o Igepal CA 630.

50 En realizaciones particulares, el tampón alcalino, como se usa en el presente documento, tiene un valor pKa por encima de 9. Ejemplos del mismo son borato, carbonato, CAPS (N-ciclohexil-3-amino-propanosulfónico), CAPSO (ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfenico), CHES (ácido 2-(N-ciclohexilamino) etano sulfónico), pirofosfato y etanolamina. Un ejemplo particular es carbonato sódico. El tampón debe tener suficiente capacidad de tampón que

cuando se mezcla con la muestra en relaciones de acuerdo con la presente invención, el pH de la solución final es de aproximadamente 9,5 o superior.

5 En realizaciones particulares, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de filtrar la solución incubada en un filtro con un tamaño de poro que retiene microorganismos en el filtro, tal como un filtro con un tamaño de poro de menos de 0,7 μm , más preferiblemente menos de 0,5 μm . El procedimiento de la presente invención facilita la filtración de elevados volúmenes de muestra sin etapas del proceso enzimático o termo-relacionado.

10 En realizaciones particulares, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de añadir, después de la lisis selectiva de acuerdo con la invención, un ácido o un tampón ácido para obtener un pH entre aproximadamente 7 y 9, una "etapa de neutralización".

15 En realizaciones particulares, los procedimientos que se han descrito anteriormente están seguidos de detección de los microorganismos. Ejemplos de los mismos son citometría, microscopia, PCR o cultivo.

20 En realizaciones particulares, los procedimientos que se han descrito anteriormente, están seguidos de la lisis de microorganismos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo (1) para la detección de microorganismos en una muestra, que comprende: una cámara de lisis (2) para aceptar un fluido de muestra con un volumen por debajo de 40 ml, preferiblemente por debajo de 20 ml, y más preferiblemente entre 1 y 20 ml, un depósito (3) que comprende un tampón alcalino con un pH de aproximadamente 9,5 o más, y que comprende un detergente no iónico, o un depósito (31) que comprende un tampón alcalino (31) con un pH de aproximadamente 9,5 o más, un depósito que comprende un detergente no iónico (32), conectado a la cámara de lisis, un filtro (4) conectado a la cámara de lisis para filtrar la muestra después de la lisis, teniendo el filtro un tamaño de poro que retiene bacterias en el filtro, y una cámara de detección (5) para ensayar la presencia de ADN.

35 En el presente documento, el tampón alcalino tiene típicamente un pKa por encima de 9,5 por lo que la solución final tendrá un pH de aproximadamente 9,5 o superior, y el detergente no iónico es típicamente Triton X-100, desoxicolato sódico, Nonidet P40 y/o Igepal CA 630.

Los procedimientos que se describen en la presente invención permiten una lisis selectiva de glóbulos blancos y rojos en una muestra mientras que las bacterias y hongos permanecen intactos (ya sean muertos o vivos).

40 Los procedimientos que se describen en la presente invención hacen posible procesar una muestra sin diluir sustancialmente dicha muestra y, en consecuencia, permiten procesar mayores volúmenes de muestra. Además, no hay necesidad de degradación enzimática de ADN mediante, por ejemplo, ADNasa o el uso de calor, haciendo este procedimiento menos complejo en comparación con procedimientos conocidos en la técnica.

45 Los procedimientos que se describen en la presente invención dan como resultado muestras lisadas con una baja viscosidad y un mínimo de agregados, lo que hace posible filtrar grandes volúmenes de la muestra lisada sobre un filtro que retiene bacterias. El procesamiento adicional de las bacterias en dicho filtro puede continuar con volúmenes entre aproximadamente 100-1000 μl , lo que hace posible procesar grandes volúmenes de muestra para procedimientos posteriores, y realizar las manipulaciones necesarias, tales como neutralización y lavado, completamente automatizadas en un cartucho integrado.

Las anteriores y otras características, rasgos y ventajas de la presente invención se serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, que ilustran, a modo de ejemplo, los principios de la invención. Esta descripción se da únicamente a modo de ejemplo, sin limitar el alcance de la invención. Las figuras de referencia que se citan a continuación se refieren a los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la eficacia de filtración de grandes volúmenes de sangre después de la lisis selectiva a diferentes valores de pH de acuerdo con una realización particular de los procedimientos de la invención.

La figura 2 muestra la recuperación de diferentes bacterias después de la lisis a diferentes valores de pH de acuerdo con una realización particular de los procedimientos de la invención.

La figura 3 muestra la recuperación de diferentes bacterias después de la lisis en diferentes tiempos de incubación de acuerdo con una realización particular de los procedimientos de la invención.

La figura 4 muestra la reducción de ADN de fondo humano mediante lisis selectiva de acuerdo con la presente invención.

Las figuras 5 y 6 muestran la detección de diferentes tipos de patógenos en 1 y 5 ml de sangre completa respectivamente.

La figura 7 muestra una comparación entre un procedimiento realizado de forma manual o con dispositivo de acuerdo con la presente invención.

La figura 8 muestra una comparación del procedimiento de acuerdo con la invención con una prueba de detección de sepsis disponible en el mercado.

La figura 9 muestra la lisis de patógenos después de la lisis selectiva y la capture en el filtro de acuerdo con la presente invención.

La figura 10 muestra la eficacia de la lisis de patógenos en comparación con otros procedimientos de lisis cuando se realizan después de la lisis selectiva y la capture en el filtro de acuerdo con la presente invención.

La figura 11 muestra una visión esquemática de una realización de un dispositivo para realizar una lisis selectiva como se describe en las realizaciones de la presente invención.

La figura 12 muestra un ejemplo de un dispositivo integrado que comprende una unidad de lisis selectiva como se describe en las realizaciones de la presente invención.

En las diferentes figuras, los mismos signos de referencia se refieren a elementos iguales o análogos.

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a ciertos dibujos, pero la invención no se limita a las mismas, sino solo por las reivindicaciones. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no deberán interpretarse como limitantes del alcance. Los dibujos descritos son únicamente esquemáticos y no son limitantes. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede exagerarse y no dibujarse a escala para fines ilustrativos. Cuando se usa el término "que comprende en la presente descripción y las

reivindicaciones, esto no excluye otros elementos o etapas Cuando se usa un articulo indefinido a definido al hacer referencia a un nombre singular, por ejemplo "un" o "una", "el" o "la", este incluye un plural de ese nombre, a menos que se indique especificamente otra cosa.

5 Además, los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe apreciarse que los términos usados de este modo son intercambiables en las circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento son capaces de funcionar en otras secuencias
10 que las descritas o ilustradas en el presente documento.

Los siguientes términos o definiciones se proporcionan únicamente para facilitar el entendimiento de la invención. No debe interpretarse que estas definiciones tienen un alcance menor que el entendido por un experto en la técnica.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

"Células sanguíneas" en el contexto de la presente invención se refiere a células mamíferas presentes en la sangre e incluye glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas sanguíneas (trombocitos).

20

"Sangre completa" en el contexto de la presente invención se refiere a sangre no procesada que comprende plasma y células sanguíneas, potencialmente tratada con un anticoagulante.

25

"Muestra" se refiere a una suspensión acuosa que comprende material celular y comprende fluidos corporales, tales como linfa, líquido cefalorraquídeo, sangre (sangre completa y plasma), saliva, pero también comprende, por ejemplo, la fracción acuosa de suspensiones homogeneizadas, tales como, por ejemplo, músculos, cerebro, hígado u otros tejidos.

30

"Eucariótico" en la presente invención se refiere a cualquier tipo de organismo eucariótico, excluyendo a los hongos, tales como animales, en particular, animales que contienen sangre, y comprende animales invertebrados, tales como crustáceos y vertebrados. Los vertebrados comprenden tanto animales de sangre fría (peces, reptiles, anfibios) como animales de sangre caliente (aves y mamíferos). Los mamíferos comprenden en particular primates, y más particularmente seres humanos.

35

"Lisis selectiva", como se usa en la presente invención, se obtiene cuando en una muestra (tal como sangre) el porcentaje de células de microorganismos (tales como células bacterianas) en esa muestra que permanece intacta es significativamente mayor (por ejemplo 2, 5, 10, 20, 50, 100, 250, 500 ó 1000 veces más) en comparación con el porcentaje de las células eucariotas del organismo del cual se recoge la muestra que permanece intacta.

40

"Microorganismo", como se usa en la presente invención, se refiere a bacterias (bacterias gram positivas y gram negativas, así como esporas bacterianas) y hongos unicelulares, tales como levaduras y mohos, que están presentes en el organismo a partir del cual se ha recogido una muestra, típicamente como un patógeno.

45

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la lisis selectiva de células eucariotas, en particular células animales, en una muestra, que contiene, o se sospecha que contiene, microorganismos tales como bacterias. El objetivo del procedimiento es aumentar la sensibilidad de una prueba para la detección de cantidades mínimas de bacterias en una muestra (es decir, menos de 10000, 1000, 100 o incluso menos microorganismos por ml de muestra). Como se explica en los antecedentes de la invención, el

50

ADN de células eucariotas, en particular de células animales, en una muestra interfiere con los procedimientos de detección basados en PCR y este ADN, junto con proteínas y membranas forman agregados que aumentan la viscosidad después de la lisis y que tiene un impacto dramático en la filtración de una muestra lisada. Para resolver este problema, las células eucariotas, en particular las células animales, se lisan selectivamente por lo que una parte sustancial (es decir, más del 20%, 40%, 60%, 80%, 90% o incluso más del 95%) de los microorganismos permanecen vivos, o si eliminan por el tratamiento, aún comprenden el ADN bacteriano en la pared celular. En los procedimientos que se describen en la presente invención se abordan los problemas que se han mencionado anteriormente.

Los procedimientos que se describen en la presente invención pueden aplicarse particularmente a cualquier tipo de muestra en la que la detección del ADN procedente de microorganismos, particularmente de bacterias, se altera por la presencia de otras células que comprenden ADN, en particular células de un huésped donde el microorganismo está presente como un patógeno.

Los procedimientos que se describen en la presente invención se ilustran ahora adicionalmente para realizaciones en las que se investiga la presencia de cantidades mínimas de bacterias en una muestra de sangre de mamífero.

La muestra sanguínea puede almacenarse como sangre completa o una fracción procesada, tal como plasma o una preparación plaquetaria. Típicamente, los procedimientos que se describen en la presente invención se realizan en sangre completa recién aislada. Dichas muestras se tratan generalmente con, por ejemplo, heparina, EDTA o citrato para evitar la coagulación.

Como alternativa, el procedimiento se realiza en sangre fresca extrayendo la sangre de la vena directamente en un tubo con detergente y tampón.

Por consiguiente, una muestra de sangre fresca o una muestra conservada se complementa con un tampón y un detergente no iónico. La selección del tampón y su concentración se seleccionan con el fin de compensar la capacidad tamponante de la muestra de sangre proporcionada y para obtener un pH alrededor de o mayor de 9,5, más particularmente entre 9,5 y 11,5, incluso más particularmente entre 9,5 y 10,5. Los valores de pH por encima de 11,5 son adecuados para organismos más robustos, tales como bacterias gram positivas y hongos. De forma análoga, el tampón se concentra lo suficientemente de tal forma que como mucho se añada un volumen de tampón del 200%, 150%, 100%, 50%, 20% o el 10% del volumen de muestra a la muestra para obtener el cambio necesario en el pH.

Los tampones adecuados en el contexto de la presente invención típicamente tienen un pKa por encima de 9, por encima de 9,5 o incluso por encima de 10, e incluyen borato, carbonato, CAPS, CAPSO, CHES, pirofosfato, etanolamina, y otros tampones usados habitualmente con una capacidad tamponante óptima en los intervalos de pH que se han mencionado anteriormente.

Los detergentes adecuados son detergentes no iónicos, que, por un lado, tienen un efecto lítico únicamente en las células eucariotas, en particular las células animales, y, por otro lado, tienen un efecto solubilizante sobre el ADN y las proteínas.

Ejemplos de detergentes no iónicos son alquil glucósidos, Brij 35 (C₁₂E₂₃ Polioxietilenglicoldodecil éter) (15,7), Brij 58 (C₁₆E₂₀ Polioxietilenglicoldodecil éter) (16), Genapol (13 a 19), glucamidas, tales como MEGA-8, -9, -10, octilglucósido (12,6), Pluronic F127, Triton X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n) (13,4), Triton X-114 (C₂₄H₄₂O₆) (12,4), Tween 20

(Polisorbato 20) (16,7) y Tween 80 (Polisorbato 80) (15) Nonidet P40 desoxicolato sódico, Triton X-100 reducido y/o Igepal CA 630. Un ejemplo preferido particular de un detergente no iónico es Triton-X 100.

- 5 La concentración más eficaz de detergente depende de detergente a detergente, pero típicamente este dentro del intervalo de entre el 0,1 y el 5%, más particularmente entre el 0,1 y el 1%. Dependiendo del detergente (sólido ó líquido) % se refiere a respectivamente % p/v, o % v/v.
- 10 La incubación de una muestra de sangre en presencia de tampón y detergente se realiza en 10 minutos, preferiblemente entre 30 segundos y 10 minutos y mas preferiblemente entre aproximadamente 1 a 3, 1-5, 1-8, 2-6 01-10 minutos, a temperaturas entre 10°C y 30 °C, más preferiblemente aproximadamente la temperatura ambiente.
- 15 Los procedimientos de acuerdo con la presente invención tienen la ventaja de que se obtiene una lisis selectiva en menos de 10 minutos, a temperaturas por debajo de 30 °C. Por consiguiente, los procedimientos pueden realizarse generalmente a temperaturas ambiente sin la necesidad de calentar la muestra.
- 20 Opcionalmente, después de la lisis, el pH de la muestra lisada se lleva a un valor neutro (es decir, entre 7 y 9) mediante la adición de un ácido o un tampón ácido en una etapa de neutralización. Se descubrió que una muestra lisada a pH neutro puede almacenarse durante un tiempo prolongado (hasta 1, 2, 6, 12 ó incluso 24 horas) sin una lisis adicional de las células bacterianas y sin cambios dramáticos en las propiedades fluidas de la muestra lisada.
- 25 Otro parámetro investigado en los procedimientos de la presente invención es la evaluación de las propiedades fluidas de la muestra de sangre después de la lisis. Esto puede determinarse verificando qué volumen de sangre lisada puede filtrarse a través de un filtro de 0,22 µm. Los procedimientos de acuerdo con la presente invención permiten la filtración de al menos 2, 5, 7, 30 5 o incluso 10 ml de sangre completa que se diluyó mediante la adición de 1 volumen de solución de tampón/detergente a 1 volumen de muestra.
- Generalmente, los procedimientos de acuerdo con la presente invención comprenden una etapa en la que las células bacterianas intactas se separan de la muestra, típicamente se realiza por centrifugación o filtración. En realizaciones particulares, las bacterias intactas se separan de la muestra por el paso de la muestra lisada por un filtro con un tamaño de poro por debajo de 1 µm, para retener las bacterias que tienen típicamente un tamaño entre 0.5 y 10 µm, tales como filtros disponibles en el mercado con un tamaño de poro de 0,4 ó 0,22 µm. Para la filtración de muestras existe una amplia diversidad de dispositivos disponibles en el mercado, tales como filtros adaptados para ajustarse en una jeringa de tal manera que después de la lisis dentro de una jeringa, el fluido pueda pasarse por el filtro mediante presión manual sobre el émbolo de la jeringa.
- 35
- 40
- 45 En lo sucesivo puede investigarse la presencia de bacterias (u hongos) en el filtro. En realizaciones particulares, la presencia de microorganismos se investiga per PCR. Para este fin, las bacterias (u hongos) pueden eliminarse mediante lavado del filtro y tratarse adicionalmente para su amplificación per PCR. Como alternativa, el filtro se aclara con un tampón de lisis para liberar el ADN de los microorganismos, que se usa adicionalmente en una reacción de PCR.
- 50 Pueden realizarse otras etapas de detección mediante citometría, microscopia, PCR o cultivo.

La lisis de la muestra, la filtración y la detección de microorganismos puede realizarse en un dispositivo (representado esquemáticamente en la figura 11). Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo (1), que comprende una cámara de lisis (2) para aceptar un fluido de muestra con un volumen entre 1 y 10 ml, un depósito (3) que comprende un tampón alcalino con tensioactivos como se ha descrito anteriormente, o un depósito que comprende un tampón alcalino (31) como se ha descrito anteriormente, y un depósito que comprende tensioactivos (32) como se ha descrito anteriormente, estando los depósitos conectados a la cámara de lisis (2). En el dispositivo, la cámara de lisis se conecta a un filtro (4) para filtrar la muestra después de la lisis por lo que los microorganismos se retienen en el filtro. El dispositivo comprende adicionalmente canales para eliminar los microorganismos del filtro y lisarlos en una cámara separada. Como alternativa, el dispositivo comprende adicionalmente medios para lisar los microorganismos en el filtro, y canales para transferir ADN procedente de células bacterianas o fúngicas lisadas del filtro a una cámara separada. El dispositivo puede contener adicionalmente una cámara de purificación y detección de ADN (5) para ensayar la presencia de ADN. Típicamente, la cámara de detección es un módulo PCR.

En la figura 12, se representa un ejemplo de un dispositivo en el que tiene lugar la lisis selectiva y la purificación e identificación de ADN posterior.

Otras disposiciones de los sistemas y los procedimientos que incluyen la invención serán obvias para los expertos en la técnica.

Debe apreciarse que aunque las realizaciones preferidas, construcciones específicas y configuraciones, así como los materiales, se han analizado en el presente documento para dispositivos de acuerdo con la presente invención, pueden hacerse diversos cambios o modificaciones en forma y detalle sin apartarse del alcance y espíritu de esta invención.

EJEMPLO 1

Efecto del pH en la filtración

El objetivo de este experimento es evaluar el efecto del pH del tampón en la eficacia de filtración. La capacidad del tampón fue suficiente para obtener un pH similar en la solución final según se confirmó midiendo el pH de la solución final usando técnicas convencionales conocidas por el experto en la técnica.

Los tampones contenían:

- Borato de Na 1 M, pH 9,0 + Triton X-100 al 1%
- Borato de Na 1 M, pH 9,5 + Triton X-100 al 1%
- Carbonato de Na 1 M, pH 10,0+ Triton X-100 al 1%
- Carbonato de Na 1 M, pH 10,3 + Triton X-100 al 1%
- Carbonato de Na 1 M, pH 10,8 + Triton X-100 al 1%

Se mezcló 1 ml de tampón con 1 ml de sangre completa y se incubó durante 3 minutos. En lo sucesivo, se añadió el tampón de neutralización y la mezcla se filtró a través de un filtro de selección de tamaño de 25 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 0,45 µm usando una preparación de filtración de vacío. Se midió el volumen de sangre que podía pasar el filtro antes de que se obstruyera. Los resultados se muestran en la figura 1. Este experimento demuestra que

el valor de pH final debe ser aproximadamente 9,5 o superior para conseguir volúmenes suficientes de sangre filtrada para el análisis de bajas concentraciones de patógenos.

EJEMPLO 2.

5

Se muestra el efecto del pH del tampón en la recuperación de patógenos intactos (E coli) después de la lisis de las células sanguíneas:

Los tampones usados contenían:

10

- Borato de Na 1 M, pH 9,0 + Triton X-100 al 1%

- Borato de Na 1 M, pH 9,5 + Triton X-100 al 1%

15

- Carbonato de Na 1 M, pH 10,0 + Triton X-100 al 1%

- Carbonato de Na 1 M, pH 10,5 + Triton X-100 al 1%

20

Se añaden cantidades idénticas de bacterias a 1 ml de sangre. Este volumen se trata con los tampones que se han mencionado anteriormente durante 3 min. En lo sucesivo, la sangre se centrifuga (10 min, 4000 g) para recoger las bacterias intactas. Las bacterias se lisan usando un procedimiento de lisis alcalina convencional y el ADN se purifica usando columnas de centrifugación Qiagen (mini-kit de sangre QiaAmp). La cantidad de ADN se cuantifica usando PCR en tiempo real. El resultado se muestra en la figura 2.

25

La figura que se ha mencionado anteriormente muestra la recuperación de las bacterias en función del pH del tampón de lisis selectiva. A valores de pH bajos, el ADN de los glóbulos blancos no se degrada e inhibe la reacción de PCR. A valores de pH altos, las bacterias comienzan a lisarse durante la lisis selectiva y no se recuperan.

30

EJEMPLO 3.

Influencia del tiempo de incubación en la recuperación de patógenos.

35

Este ejemplo demuestra la influencia de la incubación prolongada de sangre con el tampón de lisis selectiva de acuerdo con la invención sobre la recuperación de patógenos intactos. Se añadió un número fijo de bacterias *P. aeruginosa* a la sangre. Se mezcló 1 ml de sangre de adición con 1 ml de tampón de lisis selectiva (Carbonato de Na 1 M, pH 10,0 + Triton X-100 al 1%) y se incubó durante 1, 2, 3, 5, 7 ó 10 minutos. En lo sucesivo, se añadió 1 ml de tampón de neutralización. Los patógenos se recogieron por centrifugación (10 min en 4000 g) y el granule bacteriano se lavó. Finalmente, Las células se lisaron mediante lisis alcalina convencional seguida de la purificación de ADN, usando el mini-kit de sangre QiaAmp. La cantidad de ADN recuperado se midió mediante PCR en tiempo real. Los resultados se visualizan en la figura 3 e indican que la incubación se realiza preferiblemente entre 30 segundos y 10 minutos.

45

EJEMPLO 4

Reducción del fondo humano por lisis selectiva de acuerdo con la presente invención.

50

La reducción de la cantidad de ADN de células eucariotas, más específicamente ADN de glóbulos blancos en el procedimiento actual, es importante ya que, cuando está presente, inhibirá una reacción de PCR posterior para detectar ADN o ARN de patógenos. Para probar la

cantidad de ADN de fondo restante, se procesan muestras de sangre diferentes con el protocolo de lisis selectiva de acuerdo con la presente invención, y la cantidad de ADN de glóbulos blancos en la reacción de PCR se analiza usando at kit de detección de RNasaP (Applied Biosystems). Los valores de Ct de estas muestras se comparan con las obtenidas a partir de 200 µl de muestras sanguíneas de sangre completa, donde estaba presente todo el ADN de glóbulos blancos. A partir de la bibliografía se sabe qua el ADN humano qua se origina de 200 µl de sangre complete as la cantidad máxima de ADN de fondo que puede tolerarse por una reacción de PCR sin inhibición de la amplificación de ADN de patógenos. El resultado de las reacciones de PCR diferentes se muestra en la figura 4.

Esta figura muestra la diferencia en la cantidad de fondo humano entre at 1 ml de muestras de sangre procesada de acuerdo con at procedimiento de la presente invención (Carbonato de Na 1 M, pH 10,0. Triton X-100 at 1%) y 200 µl de muestras de referencia de sangre completa. Se procesan diferentes muestras y los resultados del análisis por PCR se muestran como puntos de datos individuales. Estos resultados demuestran qua la cantidad de ADN de fondo es mucho menor (= mayores valores de Ct) en las muestras de 1 ml procesadas de acuerdo con la presente invención en comparación con los 200 µl de muestras de referencia de sangre completa. Este resultado demuestra que el ADN de glóbulos blancos se elimina eficaz y suficientemente de la muestra al usar el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

EJEMPLO 5

El objetivo de este ejemplo es demostrar la detección de diferentes tipos de patógenos de sangre completa usando el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Los diferentes tipos de patógenos, bacterias gram-negativas (*P. aeruginosa*), gram-positivas (*S. aureus*) y hongos (*C. albicans*), se mezclaron juntas en 1 ml de sangre. La muestra de sangre se trató con el tampón de lisis selectiva (1 ml de una solución 1 M de Carbonato de Na, pH 10,0 + TX-100 al 1%) durante 3 min seguido de neutralización del pH y filtración usando un filtro de selección de tamaño con poros lo suficientemente pequeños pare retener todas las células. El filtro se lavó para eliminar los inhibidores restantes, tal como hemoglobina y ADN de los glóbulos blancos En lo sucesivo, las células se lisaron tras un protocolo de lisis alcalina convencional y el ADN se purificó usando el mini-kit de sangre Qiagen.

El ADN patógeno se detectó mediante PCR en tempo real; el valor de Ct es una medida para la cantidad de ADN. Para la cuantificación, una pequeña parte de la muestra de sangre de adición se puso en places sobre una placa de agar sangre para obtener el recuento de UFC. Los datos que se presentan en la figura 5 muestran que es posible detectar un bajo número de patógenos de sangre complete. La muestra de referencia contiene el mismo número de bacterias en un pequeño volumen de tampón PBS que se lisa directamente seguido de purificación de ADN y cuantificación usando PCR en tiempo real. Las medidas de referencia y los experimentos de enriquecimiento reales de la sangre dan valores de Ct similares, demostrando de este modo las elevadas velocidades de recuperación. El control negativo (sangre sin bacterias) no muestra ninguna señal de PCR.

El ensayo permite el uso de mayores volúmenes de sangre. La preparación experimental es idéntica al ejemplo anterior pero la cantidad de sangre aumenta a 5 ml. La muestra de referencia contiene el mismo número de patógenos que la muestra de sangre de 5 ml pero las células permanecen en un pequeño volumen de PBS y se lisan directamente. Los resultados se representan en la figura 6.

Este experimento demuestra la posibilidad de recuperar un bajo número de patógenos a partir de grandes volúmenes de sangre. Los datos muestran que la concentración de ADN de patógenos recuperado es similar a la referencia. Por lo tanto, puede concluirse que la mayor

parte de los patógenos permanecen intactos durante la lisis selectiva y la reducción del ADN de glóbulos blancos es eficaz para impedir la inhibición del PCR de patógenos.

EJEMPLO 6.

5 El procedimiento de lisis selectiva de acuerdo con la presente invención puede realizarse de diversas formas, incluyendo, pero sin limitación, un procedimiento manual y un procedimiento en el que el método se realiza por un dispositivo de acuerdo con la presente invención (procedimiento integrado). El presente ejemplo compara tal procedimiento integrado y un
10 procedimiento manual. El procedimiento manual requiere etapas de pipeteado manual y centrifugación mientras que el procedimiento integrado usa un cartucho de microfluído y un filtro de selección de tamaño, capaz de realizar todas las operaciones requeridas. El protocolo bioquímico básico es similar lisis selectiva de glóbulos blancos y rojos usando una solución de Carbonato de Na 1 M + Triton X-100 al 1% seguida de una etapa de neutralización después de
15 3 min. En la siguiente etapa, la mezcla se centrifuga (manual) o se filtra (integrado) y las células se lavan y finalmente el ADN se libera por medio de un procedimiento de lisis alcalina convencional. En una última etapa, el ADN se purifica usando el mini-kit de sangre Qiagen y se detecta por PCR en tiempo real. Los resultados del procedimiento integrado y manual pueden encontrarse en la siguiente figura 7. Se consiguen resultados comparables, lo que demuestra
20 que el resultado es independiente del formato de implementación del ensayo.

EJEMPLO 7

25 En este ejemplo, el procedimiento de acuerdo con la presente invención es comparable a un procedimiento disponible en el mercado, concretamente el kit MolYsis Complete (Molzym). Este kit use agentes caotrópicos y detergentes para lisar selectivamente las células mamíferas. Esta etapa de lisis se sigue de una digestión con una ADNasa que no se ve afectada por este agente caotrópico/detergente.

30 Para este experimento, se añadió 1 ml de muestras de sangre en diferentes concentraciones de *S. aureus*. Se procesó 1 ml de sangre como se describe en el Ejemplo 5 y se procesó 1 ml más con el kit MolYsis de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de Ct se representan en relación a la concentración de células en la figura 8 y muestran que el procedimiento de acuerdo con la presente invención es al menos tan eficaz como el kit MolYsis
35 conocido sin la adición de enzimas o sales caotrópicas.

EJEMPLO 8

40 Después de la lisis selectiva de células sanguíneas y el enriquecimiento de las células de patógenos en el filtro de selección de tamaño, se empleó lisis alcalina para conseguir la lisis simultánea de diferentes patógenos en el filtro para hacer disponible el ADN para el análisis por PCR.

45 La figura 9 muestra el resultado del procedimiento de lisis alcalina realizado en un cartucho integrado. Se añadió 1ml de sangre a 10^6 células de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Después de la selectiva de células sanguíneas y el enriquecimiento de patógenos en el filtro, se realizó la lisis alcalina, usando 200 μ l de una solución que contiene NaOH 200 mM, SDS al 0,5% que se incubó a 95°C durante 10 min para obtener la lisis completa de los patógenos en el filtro. Los eluatos que contienen el ADN de patógenos se neutralizaron con 20 μ l de una
50 solución M de ácido cítrico y se purificaron usando el Mini-kit de ADN/Sangre QIAamp. Como una muestra de control, se lisaron 10^6 células de cada patógeno en el banco, se neutralizaron y se purificaron como se ha descrito anteriormente.

5 Para la optimización y la prueba de comparación del procedimiento de lisis alcalina, se seleccionó *Candida albicans* como sistema modelo ya que estas células de levadura se conocen bien por sus paredes celulares rígidas que son difíciles de lisar. La figura 10 compara el procedimiento de lisis alcalina (usando NaOH 50 mM, SDS al 0,25% en combinación con tratamiento de calor) con otros procedimientos de lisis, concretamente tratamiento de ultrasonidos de alta densidad (HiFU) y un kit comercial (kit de lisis BD GeneOhm). Para la lisis alcalina y la lisis mediante el kit comercial, las muestras se concentraron de 1 ml a 160 y 100 μ l, respectivamente, usando centrifugación. Para el tratamiento HiFU se usaron 2 ml de solución celular, sin concentración previa. Después de la lisis, las células no lisadas y los residuos se eliminaron de la muestra por centrifugación. Se uso 1 μ l de lisado en bruto como entrada para el PCR.

15 La combinación de NaOH y SDS es más eficaz para la lisis que cada uno de los compuestos individuales. Un aumento de la concentración de cualquier compuesto no aumentó adicionalmente la eficacia de la lisis. La lisis alcalina sin una etapa de incubación de calor es significativamente menos eficaz. La eficacia de la lisis puede aumentarse por incubación durante 2 min a 95 °C, sin embargo, para la integración del ensayo en un cartucho se prefiere una incubación durante mayor tiempo a 70°C.

20 Para la lisis alcalina, las células se suspendieron de nuevo en 100 μ l de una solución de lisis que contiene NaOH 50 mM y SDS al 0,25%. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 10 min a 70°C, se enfriaron rápidamente a temperatura ambiente y se neutralizaron mediante la adición de 30 μ l de Tris-HCl 500 mM, pH 7,0 (produciendo un concentración final de Tris 150 mM, es decir, 3 veces la concentración de NaOH).

25 Para el análisis por PCR del lisado en bruto, las células no lisadas y los residuos se eliminaron de la muestra por centrifugación (5 min, 14.000 g). Se añadió 1 μ l de sobrenadante a 25 μ l de reacción de PCR. La detección por PCR se basó en un ensayo PCR Taqman en dirección al gen ARNr (Apollo). La reacción de PCR se realizó en una mezcla maestra Universal Taqman (Applied Biosystems), usando un cebador directo 500 nM y un cebador indirecto 300 nM y una sonda marcada con FAM-BHQ1 (todos los oligonucleótidos se sintetizaron de forma personalizada por Biologio BV). La reacción de PCR se realizó en un sistema de PCR en tiempo real Biorad CFX. Después de una etapa de calor inicial de 10 min a 95 °C para activar la polimerasa con inicio caliente, se usaron 50 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C para la amplificación. Se detectaron señales de fluorescencia en cada ciclo durante la etapa de 60°C. El análisis de datos se realizó con el software Biorad CFX.

40

45

50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la lisis selectiva de células animales en una muestra que contiene, o se sospecha que contiene, un microorganismo, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5
- a) proporcionar una muestra con células animales que contiene, o se sospecha que contiene un microorganismo,
 - b) añadir un detergente no iónico y un tampón a dicha muestra para obtener una solución con un pH de aproximadamente 9,5 o superior, en la que la relación entre el volumen de detergente añadido y el tampón añadido y el volumen de muestra está entre 2/1 y 1/10,
 - c) incubar dicha solución durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo para lisar las células animales.
- 15
2. Un procedimiento para la lisis selectiva de células animales en una muestra que contiene, o se sospecha que contiene, un microorganismo, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 20
- a) proporcionar una muestra con células animales que contiene, o se sospecha que contiene, un microorganismo,
 - b) añadir un detergente no iónico y un tampón a dicha muestra para obtener una solución con un pH de aproximadamente 9,5 o superior, en la que el detergente no iónico está presente en una concentración en el intervalo de entre el 0,1 y el 5 % (% p/v p % v/v),
 - c) incubar dicha solución durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo para lisar las células animales.
- 25
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha muestra es una muestra de sangre de mamífero.
- 30
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha muestra de sangre es sangre completa.
- 35
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho microorganismo es una bacteria.
- 40
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho microorganismo es un hongo.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha etapa de incubación c) se realiza entre 30 segundos y 10 minutos.
- 45
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la relación entre el volumen de detergente añadido y de tampón añadido y el volumen de muestra está entre 2/1 y 1/10.
- 50
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 7, en el que el detergente no iónico está presente en una concentración del 0,1 y el 5% (% p/v o % v/v).

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el detergente no iónico se selecciona entre el grupo que comprende Nonidet P40, desoxicolato, Igepal CA 630) y/o Triton-X 100.
- 5 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente la etapa de centrifugar dicha solución incubada y aislar dichos microorganismos.
- 10 12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente la etapa de filtrar dicha solución incubada en un filtro con un tamaño de poro que retiene los microorganismos en dicho filtro.
- 15 13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende adicionalmente la etapa de lisar dichos microorganismos.
14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende adicionalmente un ensayo molecular basado en ácidos nucleicos.
- 20 15. Un dispositivo (1) para la detección de microorganismos en la muestra, que comprende:
- 25 - una cámara de lisis (2) para aceptar un fluido de muestra con células animales que contiene, o se sospecha que contiene, un microorganismo un microorganismo con un volumen por debajo de 40
- 30 - un deposito (3) que comprende un tampón alcalino con un pH de 9,5 o superior, y que comprende un detergente no iónico, o un deposito que comprende un tampón alcalino (31) con un pH de aproximadamente 9,5 o más, y un deposito que comprende un detergente no iónico (32), conectado a la cámara de lisis,
- un filtro (4) conectado a la cámara de lisis para filtrar la muestra después de la lisis de células animales, teniendo dicho filtro un tamaño de poro que retiene bacterias en el filtro, y
- una cámara de detección (5) para ensayar la presencia de ADN.
- 35 16. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el tampón alcalino tiene un pKa por encima de 9,0 y/o el detergente no iónico es Triton X-100.

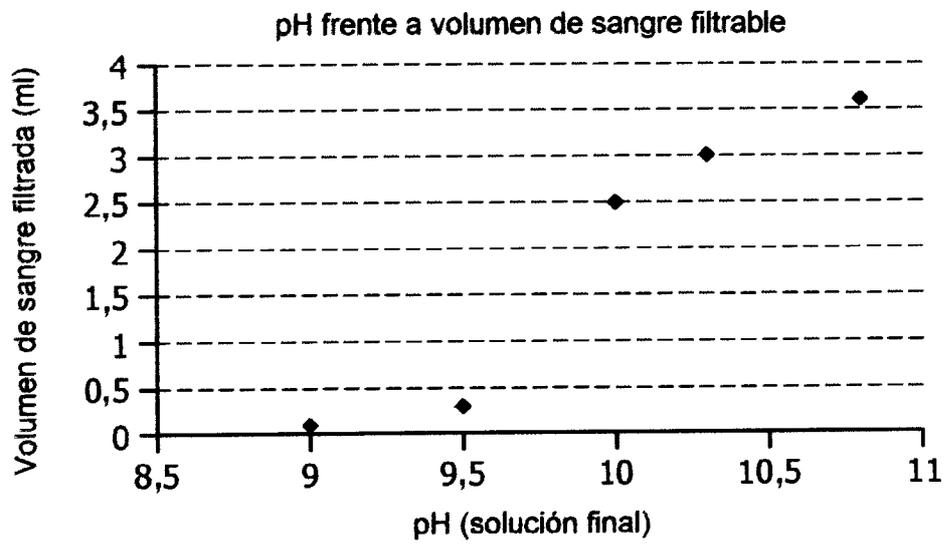


FIG. 1

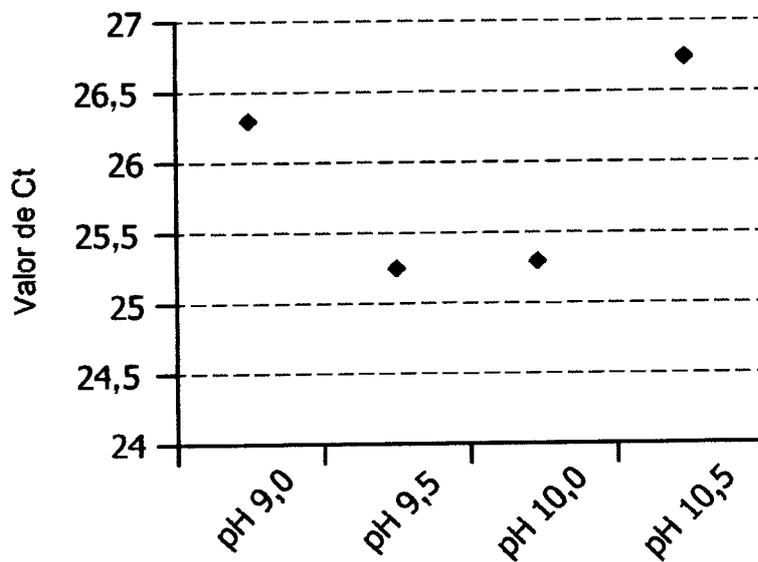


FIG. 2

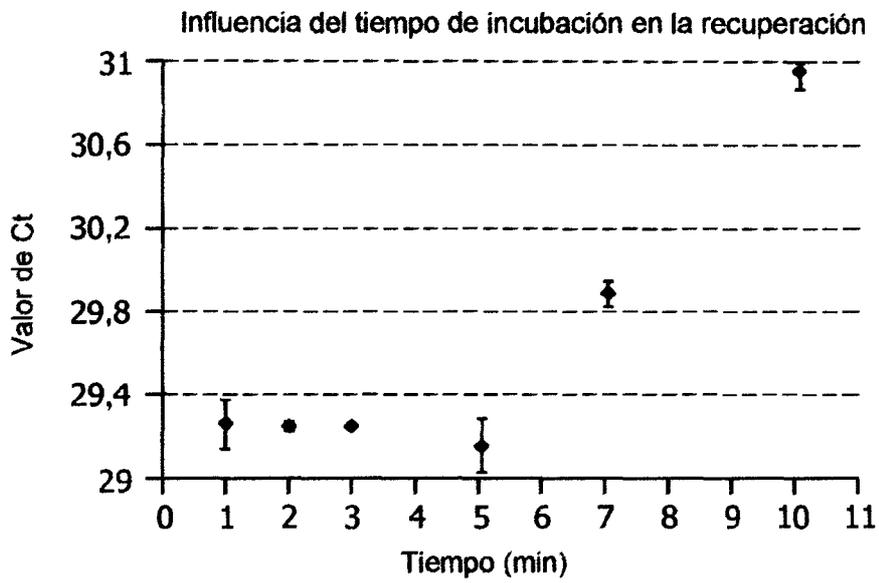


FIG. 3

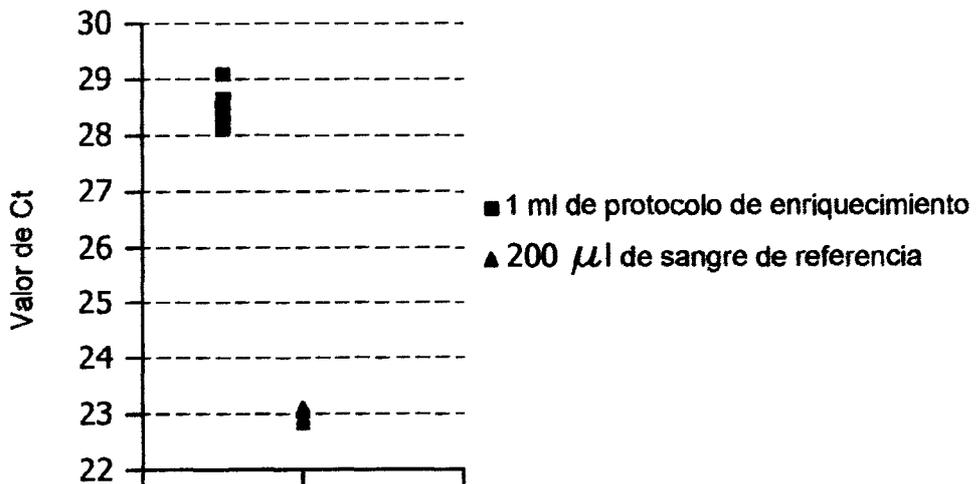


FIG. 4

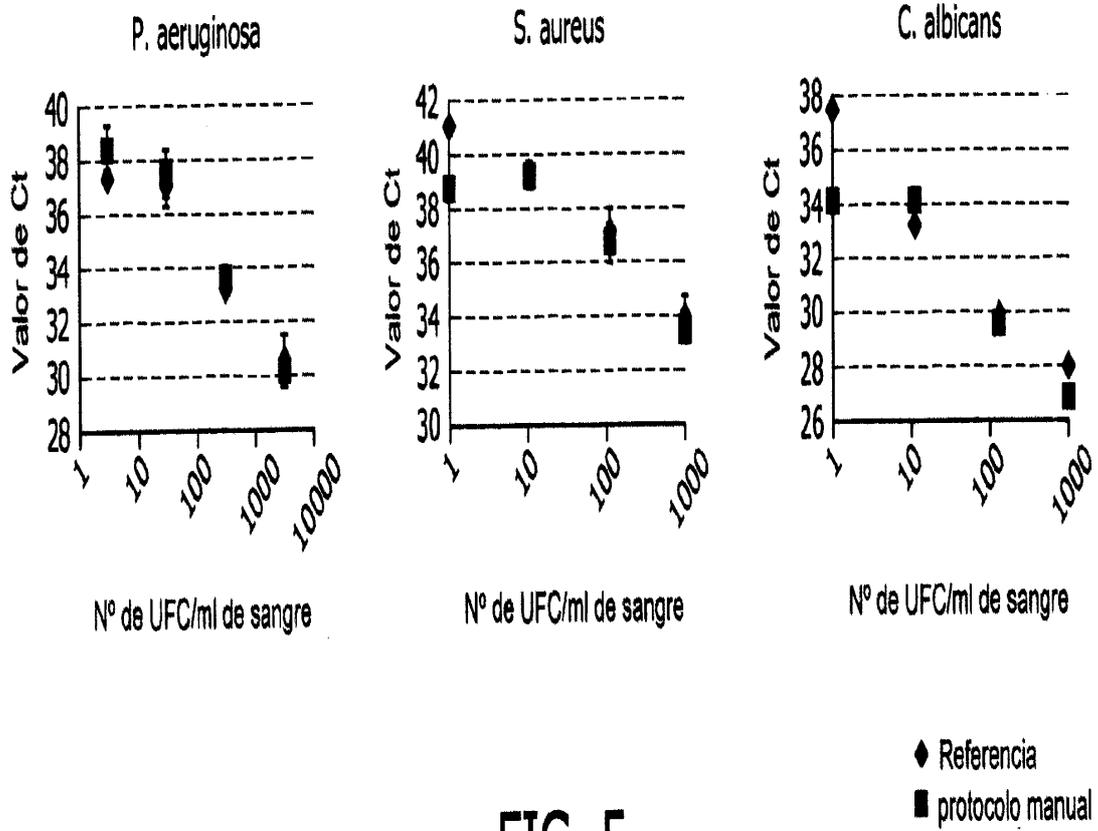


FIG. 5

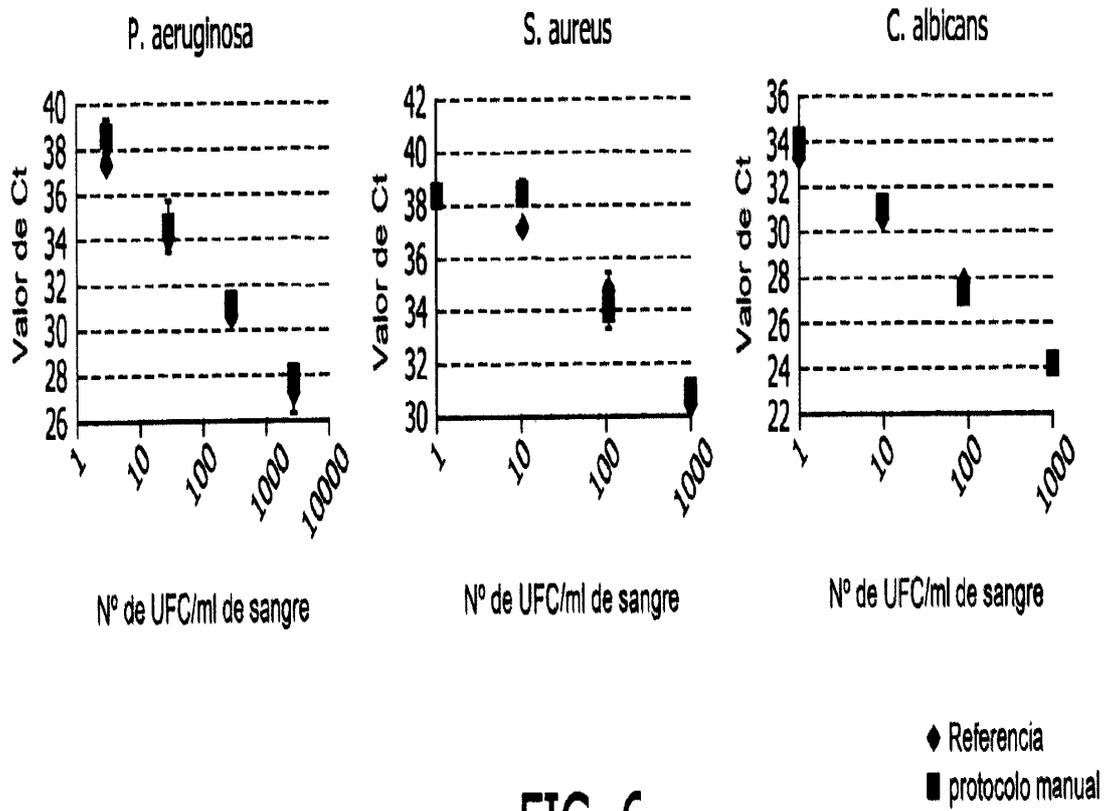


FIG. 6

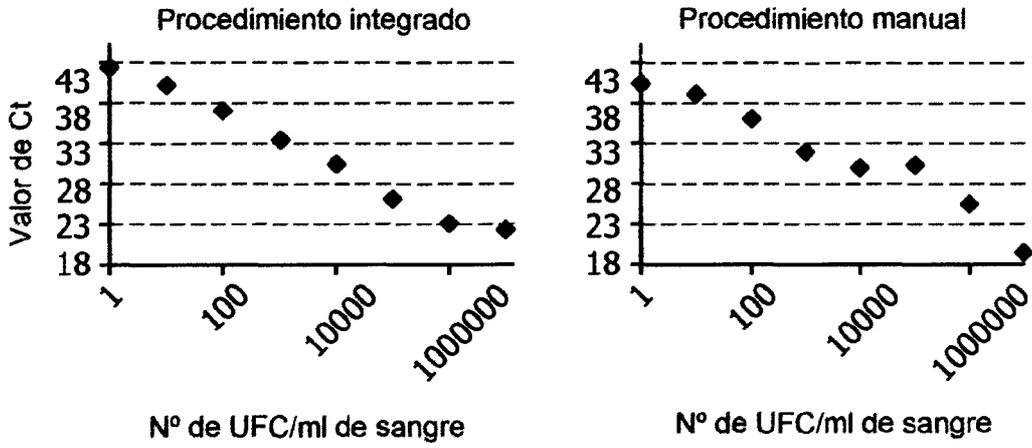


FIG. 7

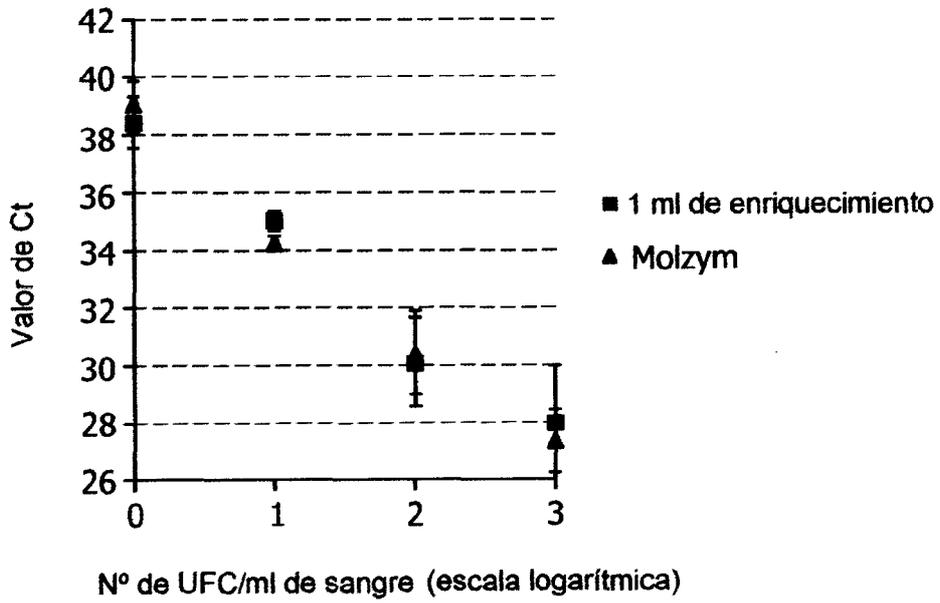


FIG. 8

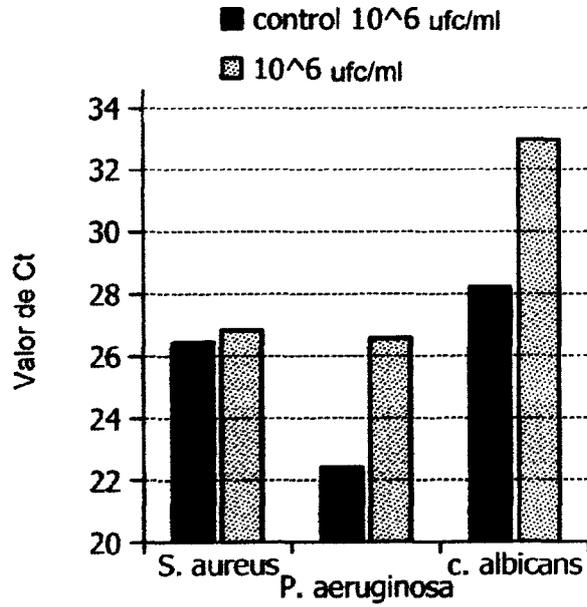


FIG. 9

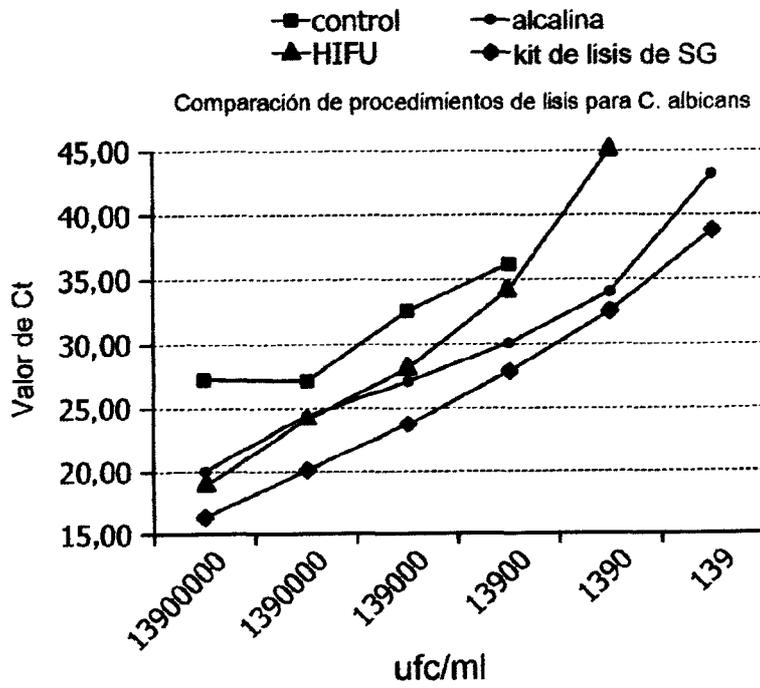


FIG. 10

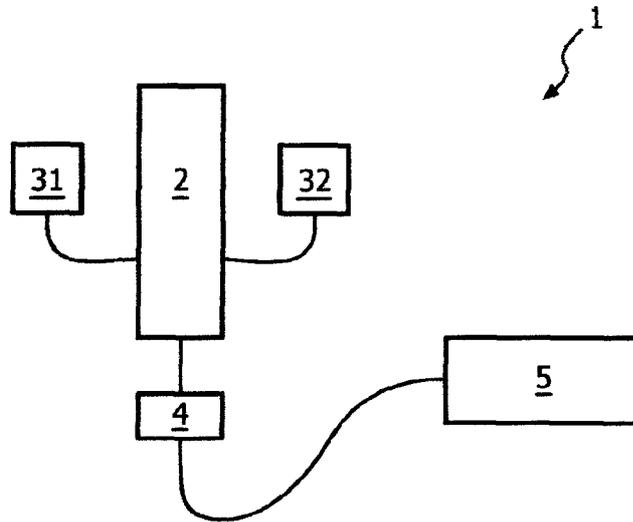


FIG. 11

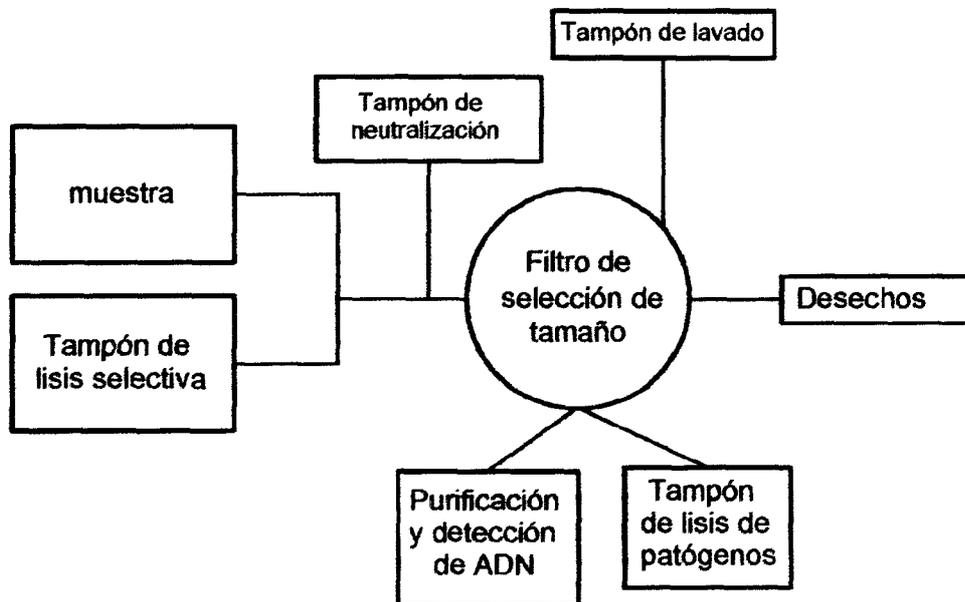


FIG. 12