

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 455**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00	(2006.01)
C11D 1/66	(2006.01)
C12N 1/06	(2006.01)
C12N 1/14	(2006.01)
C12N 1/16	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
C12N 15/10	(2006.01)
C12Q 1/68	(2006.01)
C12P 19/34	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 08783325 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2185681**

54 Título: **Concentración y enriquecimiento de células microbianas y ácidos nucleicos microbianos a partir de fluidos corporales**

30 Prioridad:

02.08.2007 US 935244 P
20.12.2007 US 8292

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ LAVAL (100.0%)
Vice-rectorat à la recherche et à la création,
Pavillon des Sciences de l'Education, 2320, Rue
des Bibliothèques, Local 1434
Quebec, QC G1V 0A6 , CA

72 Inventor/es:

PEYTAVI, RÉGIS;
HULETSKY, ANN;
BELLEY-MONTFORT, LUCILE y
MARTINEAU, ISABELLE

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 531 455 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

Concentración y enriquecimiento de células microbianas y ácidos nucleicos microbianos a partir de fluidos corporales

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la concentración y enriquecimiento de células microbianas y ácidos nucleicos microbianos a partir de muestras sanguíneas. La invención también se refiere a la detección de células microbianas en muestras sanguíneas.

10 **Antecedentes de la invención**

15 El desarrollo de ensayos diagnósticos moleculares rápidos para detectar infecciones humanas es la prioridad con mayor puntuación dentro de la Organización Mundial de la Salud para la mejora de la salud de la población mundial (Daar et al., 2002, Nat. Genet., 32: 229-232). Las infecciones sanguíneas graves son una causa importante de mortalidad en pacientes hospitalizados en todo el mundo y suponen uno de los retos más importantes en cuidados intensivos. Por ejemplo, estimaciones recientes de la incidencia de sepsis son de 240 casos por 100.000 en los Estados Unidos. La carga humana y económica de la sepsis es considerable (Grossi et al., 2006, Surg. Infect. (Larchmt), 7: S87-S91). A pesar de los avances en enfermedades infecciosas y el tratamiento de cuidados intensivos y de los numerosos intentos por desarrollar nuevos tratamientos, la tasa de mortalidad de la sepsis sigue siendo inaceptablemente alta, oscilando entre el 20% y el 50%. El reconocimiento de los signos de infección sanguínea severa y/o de sepsis severa y la realización de una diagnosis temprana y precisa de la misma son claves para mejorar los cuidados y aumentar la tasa de supervivencia. De hecho, un diagnóstico rápido podría aumentar la supervivencia de un paciente reduciendo el intervalo de tiempo entre la toma de muestra sanguínea y la aplicación de la terapia antimicrobiana.

25 Existe una necesidad de ensayos diagnósticos eficaces y precisos para determinar infecciones de fluidos corporales que i) recuperen células microbianas suficientes para su detección, ii) recuperen células microbianas de forma rápida, iii) recuperen una gran diversidad de especies microbianas, y iv) identifiquen patógenos de forma rápida y precisa. La presente invención busca satisfacer ésta y otras necesidades.

30 Durante varias décadas se han usado diferentes estrategias para tratar de satisfacer dichas necesidades. El estándar actual es un sistema de cultivo sanguíneo basado en un caldo de cultivo que favorece el crecimiento de los microorganismos presentes en una muestra de sangre, permitiéndoles multiplicarse hasta un nivel detectable (Cockerill et al., 1996, J. Clin. Microbiol., 34: 20-24; Murray et al., 1991, J. Clin. Microbiol., 29: 901-905). Sin embargo, dicha técnica implica el subcultivo posterior en medio sólido para el aislamiento e identificación de especies microbianas. Por consiguiente, se requieren varios días para obtener un diagnóstico preciso.

35 Las saponinas son glucósidos tensioactivos naturales que tienen propiedades superficiales. Son producidos principalmente por plantas pero también por animales marinos inferiores y algunas bacterias. Consisten en un resto azúcar ligado a una aglicona hidrofóbica (saponina). La gran complejidad de la estructura de la saponina se debe a la variabilidad de la estructura de la aglicona, a la naturaleza de las cadenas laterales y a la posición de la unión de dichas funciones en la aglicona (Francis et al., 2002, British J of Nutrition, 88: 587-605). Se sabe que las saponinas interaccionan con membranas de células eucarióticas. Las saponinas se usan habitualmente en concentraciones de 0,04%-0,2% para permeabilizar membranas plasmáticas. Dicha permeación puede conducir incluso a la destrucción de la membrana generando la muerte celular. Este proceso depende de la concentración aplicada y de la estructura molecular específica de la saponina usada (Melzig, et al. 2001, Planta Med., 67: 43-48). Se ha demostrado que el sitio de unión a la membrana es un colesterol (Milgate et al., 1995, Nutrition Research, 15, no. 8; 1223-1249). Una vez unidas al colesterol, las saponinas inducen cambios en la estructura de la membrana y en la permeabilidad asociadas a la alteración de la homeostasis iónica entre el compartimento intracelular y el extracelular. En levaduras, en la membrana en lugar de colesterol hay moléculas de ergosterol. Algunos estudios han demostrado que las saponinas esteroideas (saponinas neutras) preservan tanto la actividad hemolítica como la fúngica, mientras que las saponinas triterpenoides (saponinas ácidas) solo muestran actividad hemolítica sin actividad antifúngica detectable. Se ha sugerido que las saponinas triterpenoides pueden presentar una afinidad más débil por el ergosterol que el colesterol (Takechi et al. 2003, Phytother. Res., 17: 83-85). Leconte et al. (Leconte et al. 1997, Phytochem., 44: 575-579) demostraron que los cicloiridales, una clase de triterpenoides procedentes de varias especies de Iris, fueron capaces de estabilizar membranas de levadura tras un tratamiento de ruptura mediante saponinas esteroideas. Se han detectado saponinas triterpenoides en muchas legumbres tales como semillas de soja, judías, guisantes y alfalfa, así como en alliums, té, espinaca, remolacha azucarera, quinoa, regaliz, girasol, castaña de indias y ginseng. Un grupo ampliamente estudiado de saponinas triterpenoides es el producido a partir de *Quillaja saponaria*, un árbol nativo de la región de los Andes (Francis et al., 2002, British J of Nutrition, 88: 587-605). Las saponinas representan el 20-25% del material extraíble de dicha fuente (Barr, et al., 1998, Ad Drug Deliv Rev, 32: 247-271). Las preparaciones de saponina disponibles comercialmente pueden inhibir el crecimiento bacteriano. Los contaminantes antibacterianos de bajo peso molecular pueden ser eliminados de las saponinas disponibles comercialmente

mediante purificación de los extractos por filtración (Dorn, G., Detoxification of saponins, Patente de EE.UU. nº 3.883.425, 1975).

- 5 Dorn et al. (Patente de EE.UU. 4.164.449) desarrollaron un método para lisar componentes sanguíneos con un mínimo de 0,1 mg/mL y un máximo de 20 mg/mL de saponina purificada. Este método concentra células microbianas mediante centrifugación y las células recuperadas son inoculadas sobre una placa de agar. Un producto basado en este método se vende comercialmente como Isostat®/Isolator™ (anteriormente conocido como Isolator™ 10) y contiene 1,83 mg/mL de saponina purificada una vez mezclada con la muestra de sangre (Carter-Wallace, Inc., Cranbury, N.J. 08512-0181). Este método permite la detección de bacteremia y fungemia de bajo nivel provocadas por *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus epidermidis* y levaduras en entre 1 y 2 días (McLaughlin et al. 1983, J. Clin. Microbiol., 18: 1027-1031; Kiehn et al., 1983, J. Clin. Microbiol., 18: 300-304). El aumento de sensibilidad y el menor tiempo de detección pueden deberse a la concentración de células microbianas del volumen inicial de muestra sanguínea. Otra explicación para la mejor detección obtenida con el Isolator™ 10 puede estar relacionada con la liberación de microorganismos intracelulares después de la lisis de algunos leucocitos por tratamiento con saponina. (Taylor, 1994, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13: 249-252 ; Murray et al., 1991, J. Clin. Microbiol., 29: 901-905). Algunos fabricantes de sistemas de cultivo sanguíneo han suplementado sus medios de cultivo sanguíneo con saponina (Murray et al., 1991, J. Clin. Microbiol., 29: 901-905; sistema Becton Dickinson BACTEC™; sistema bifásico Hoffman La Roche Septi-Chek).
- 20 Varios grupos compararon medios de cultivo sanguíneo suplementados con saponina (variando entre 0,03 mg/mL y 2 mg/mL de saponina cuando se combina con una muestra sanguínea) o producto Isolator™ 10 (1,83 mg/mL de saponina cuando se combina con una muestra sanguínea) con los medios de cultivo sanguíneo estándar para detectar microorganismos en pacientes septicémicos. Estas referencias sugieren que la detección de microorganismos en un espécimen de sangre no puede basarse solo en un método que use saponina. De hecho, demostraron que el Isolator™ 10 no fue eficaz en la detección de la especie *Pseudomonas* en bacteremia de bajo nivel (Kiehn et al., 1983, J. Clin. Microbiol., 18: 300-304; Henry et al., 1983, J. Clin. Microbiol., 17: 864-869; Murray et al., 1991, J. Clin. Microbiol., 29: 901-905). Otro grupo obtuvo limitaciones similares para la detección de especies anaeróbicas (McLaughlin et al., 1983, J. Clin. Microbiol., 18: 1027-1031).
- 30 Spears et al. (Publicación EPO nº 0.745.849) presentaron el uso de una saponina o Triton™ en disolución salina para lisis sanguínea completa. Su método está dirigido a procesar especímenes sanguíneos con el objetivo de eliminar inhibidores de posteriores análisis de ácidos nucleicos. En este método, la muestra sanguínea es lisada mediante la adición de saponina hasta aproximadamente 0,2-0,5% (de 2 a 5 mg/mL).
- 35 Se usó otro método, sin saponina, para concentrar microorganismos desde el volumen de muestra sanguínea inicial (Bernhardt et al., 1991, J. Clin. Microbiol., 29: 422-425). La muestra de sangre se centrifuga para formar un gradiente de densidad con Ficoll™-hpaque para separar glóbulos rojos de leucocitos. La capa superior que contiene los leucocitos se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm para retener células microbianas en el filtro de membrana. A continuación se coloca el filtro en la parte superior de una placa de agar para permitir el crecimiento microbiano. Con este método, se detectaron todos los microorganismos tras 18 horas desde la filtración, en comparación con las 24-48 horas de un cultivo estándar. Sin embargo, de las 12 especies bacterianas evaluadas en muestras de sangre contaminadas artificialmente, solo la muestra de sangre contaminada con *Pseudomonas aeruginosa* permitió una recuperación de microorganismos equivalente al cultivo sanguíneo en placa de agar.
- 40 En resumen, los métodos de detección actuales siguen siendo lentos principalmente debido al uso de cultivos celulares microbianos para detectar patógenos aislados. Adicionalmente, los sistemas de cultivo sanguíneo (p.ej., BACTEC™, Isostat®/Isolator™) usan todas disoluciones acuosas de saponina no calentadas.
- 45 La estructura de las saponinas también sufrir transformaciones químicas durante el almacenamiento o el procesado, lo que a su vez puede modificar sus propiedades y su actividad. Se ha publicado el uso de derivados de saponina calentados en hematología (Publicación EPO nº EP 1.422.509). Este método está dirigido a la lisis de glóbulos rojos con saponina, pero limitando la actividad de lisis para preservar los leucocitos para análisis posterior. Esta disolución derivada de saponina (50 mg/mL), calentada a 121°C durante 30 minutos, se usó en combinación con un ácido y/o un tensioactivo para permitir un rango más amplio de concentraciones de saponina (0,02-0,035 mg/mL cuando se combinan con una muestra sanguínea). Además, dicha patente describe un procedimiento de calefacción que potencia la estabilidad de los reactivos con el tiempo. El análisis de HPLC indicó que el proceso de calentamiento produce un pico adicional no identificado, que además parecía no tener capacidad lítica. Se sugirió que el procedimiento de calentamiento elimina componentes inestables de la saponina que podrían degradarse con el tiempo. Se ha publicado que las saponinas procedentes de semillas de soja intactas se hidrolizan en saponinas de los Grupos B y E al calentar en disoluciones alcalinas en presencia de hierro (Güçlü-Üstündag, Ö. et al., 2007, Crit Rev Food Sci Nut: 231-258). Adicionalmente, se ha demostrado que el procedimiento de calentamiento modifica las funciones biológicas de las saponinas de soja (Okubo, K., et al, Oxygen-Saponins used in food and agriculture, Plenum Press, NY, 1996).
- 60 En la mayoría de los trabajos descritos anteriormente, las disoluciones de saponina se purifican por filtración tras disolución usando dispositivos de filtración de 0,8 a 0,2 µm con varios tipos de membranas y recogiendo el filtrado.
- 65

El efecto de la filtración en cada caso puede ser complejo de medir, ya que las variaciones en la capacidad de saponinas de diferentes fuentes para formar micelas alrededor de moléculas de colesterol pueden deberse a diferencias en las estructuras moleculares contenidas (San Martín et al., 2000, J. Sci. Food Agric., 80: 2063-2068). Puesto que la saponina de *Quillaja* es un extracto biológico más que un compuesto sintético, los productos comerciales pueden contener varias impurezas tales como sales, o moléculas tensioactivas que afectan a las capacidades de formación de micelas de las moléculas de saponina (Mitra et al., 1997, J. Agric. Food Chem., 45: 1587-1595). Dichas concentraciones son propensas a variar, ya que es difícil alcanzar de forma eficiente la disolución en agua de extractos de saponina en bruto. La saponina de corteza de *Quillaja* es soluble en alcohol, éter, acetona, acetato de etilo y/o ácido acético glacial (Güçlü-Üstündağ, Ö., et al., 2007, Crit Rev Food Sci Nut: 231-258).

En la Patente de EE.UU. nº 3.883.425, se prepara una disolución de saponina acuosa recogiendo el residuo retenido por el dispositivo de filtración en lugar del filtrado. Esta patente describe un procedimiento dirigido a eliminar constituyentes del extracto de saponina que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 600, que ha sido descrito como tóxico para organismos microbianos. Durante la filtración, dichas moléculas tóxicas pasan a través de la membrana y permanecen en el filtrado.

Los avances recientes en biología molecular han permitido el desarrollo de herramientas para la identificación precisa y sensible de patógenos del torrente sanguíneo saltándose etapas de cultivo microbiano. El progreso en las tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos ha permitido avances en la detección de cantidades pequeñas de ácidos nucleicos. Sin embargo, dichas tecnologías llevan asociados nuevos retos. Un primer desafío implica la necesidad de recuperación de la mayoría de las células microbianas a partir de una muestra para detectar ácidos nucleicos microbianos mediante amplificación sin ninguna etapa de replicación celular, incluso cuando las muestras sanguíneas contienen menos de 10 CFU/mL. Un segundo desafío implica la necesidad de reducir la proporción de ADN genómico humano/ADN genómico microbiano para favorecer la amplificación de ADN microbiano. Un tercer desafío implica la necesidad de controlar los inhibidores de amplificación de ácido nucleico procedentes de la sangre (p.ej., inhibidores de reacción en cadena de polimerasa (PCR)). La presente invención busca satisfacer éstas y otras necesidades. La PCR es con diferencia la tecnología de amplificación de ácido nucleico más popular. La diagnosis basada en PCR de infecciones microbianas y enfermedades genéticas puede verse reducida o bloqueada por la presencia de sustancias inhibidoras de PCR en las muestras de sangre (Hoorfar et al., 2004, J. Appl. Microbiol., 96: 221-222). Se han identificado inhibidores de PCR principalmente como hemoglobina y ADN de leucocitos, pero también anticoagulantes de tipo EDTA y heparina. Más recientemente, la inmunoglobulina G de plasma humano, la hemoglobina y la lactoferrina de los eritrocitos y los leucocitos, respectivamente, también han demostrado ser importantes inhibidores de la PCR diagnóstica para sangre (Al-Soud et al., 2000, J. Clin. Microbiol., 39: 485-493). Existe una necesidad de mejora del aislamiento de microorganismos de un espécimen sanguíneo que pueda ser aplicable a la detección tanto de bacterias como de hongos.

Entre los productos publicados y disponibles comercialmente, algunos métodos implican una lisis simultánea total de glóbulos rojos y blancos, así como de células microbianas para purificar ácidos nucleicos totales después (Jordan et al., 2005, J. Mol. Diagn., 7: 575-581; sistema NucliSens® easyMAG™ de BioMérieux; kit SeptiFastprep de Roche Diagnostics; y kit de extracción de ácido nucleico IsoQuick® de ISC BioExpress). Una desventaja de esta estrategia es la presencia de grandes cantidades de ácidos nucleicos de células sanguíneas en comparación con los ácidos nucleicos de células microbianas. Esto puede impedir una buena sensibilidad analítica en la detección de ácidos nucleicos microbianos.

Otros métodos proceden a lisar las células sanguíneas y las microbianas en etapas separadas, seguido de una purificación de ácidos nucleicos. Con esta estrategia, algunos grupos usan un choque hipotónico para lisar glóbulos rojos y una combinación de SDS 0,2%-proteínasa K para lisar leucocitos antes de lisar células de levadura con una digestión enzimática (White et al., 2006, Clin. Infect. Dis., 42: 479-486; Loeffler et al., 2002, J. Clin. Microbiol., 40: 2240-2243). Otro grupo usa la tecnología de Isolator™ 10 para lisar los glóbulos rojos. Las células de levadura recolectadas mezcladas con residuos de glóbulos rojos son digeridas a continuación enzimáticamente y los ácidos nucleicos se purifican (Patente de EE.UU. 5.645.992). Estos métodos fueron desarrollados para detectar únicamente especies fúngicas.

El kit MolYsis Basic5 de Molzym usa tiocianato de guanidinio y una ADNasa resistente-caotrópica para lisar células sanguíneas y eliminar sus ácidos nucleicos antes de la lisis de células bacterianas y la extracción de ácido nucleico. Bognoux et al. (Bognoux et al., 1999, J. Clin. Microbiol., 37: 925-930) usan una combinación de sacarosa y Triton™ X-100 para tratar muestras sanguíneas contaminadas con células de *Candida* para lisar células sanguíneas. Tras centrifugar las células no lisadas, la partícula obtenida se vuelve a suspender y se digiere con ADNasa I para degradar los ácidos nucleicos liberados de leucocitos. Tras digestión, se centrifuga la suspensión celular que incluye las células de *Candida* añadidas. Se desecha el sobrenadante y la partícula obtenida se vuelve a suspender y envía a tratamiento con litocasa para digerir las paredes de las células de levadura antes de la extracción de ácidos nucleicos.

El kit de preparación SeptiFast (LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}) fue desarrollado para la detección tanto de bacterias (19 grupos diferentes y 25 especies diferentes) como de hongos (6 especies diferentes). La sensibilidad analítica de este ensayo es de aproximadamente 30 CFU de microbios/mL de sangre. Este sistema requiere

numerosas etapas de manipulación y requiere aproximadamente 2 horas de manipulación antes de la extracción del ADN genómico humano y microbiano. Además, se demostró que la mayoría de las muestras sanguíneas recogidas de pacientes septicémicos puede contener tan solo 10 unidades formadoras de colonia (CFU, del inglés "colony-forming units") de microbios por mL de sangre (Jonsson et al., 1993, APMIS, 101: 595-601).

Adicionalmente a los métodos basados en ácidos nucleicos, la detección y/o la identificación de microbios puede llevarse a cabo detectando características fenotípicas, antígenos microbianos, componentes celulares y/o actividades fisiológicas de células microbianas. El análisis multiparamétrico de marcadores microbianos es útil para identificar microbios, por ejemplo, usando métodos microanalíticos y dispositivos microfabricados (Link et al., 2007, Nat. Rev. Microbiol. 5: 680-688; Weibel et al., 2007, Nat. Rev. Microbiol. 5: 209-218). Pueden requerirse células microbianas viables (y/o microbios metabólicamente activos) para llevar a cabo dichos análisis (Metzger, S. et al, reunión general de la ASM de 2008, Resumen C-145; Metzger, S. et al, reunión general de la ASM de 2008, Resumen C-005)

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para aislar microorganismos de una muestra sanguínea que tiene o se sospecha que tiene microorganismos y células hospedantes, comprendiendo dicho método:

- a. poner en contacto la muestra de sangre con una formulación de saponinas, donde la saponina es una disolución de saponina tratada en autoclave y filtrada (FATS) o una disolución de saponina tratada en autoclave, filtrada y calentada (HFATS) presente en una concentración final de 40 mg/mL a 100 mg/mL; y
 - b. obtener microorganismos aislados;
- donde los microorganismos aislados comprenden ácidos nucleicos.

La presente invención también se refiere a un método para detectar microorganismos de una muestra sanguínea que tiene o se sospecha que tiene microorganismos y células hospedantes, comprendiendo dicho método:

- a. poner en contacto una muestra de sangre con una formulación de saponina hasta una concentración final de saponina en el intervalo de 75 mg/mL a 100 mg/mL, donde dicha formulación de saponina es una disolución de saponina tratada en autoclave, filtrada y calentada (HFATS);
- b. aislar microorganismos que tengan ácidos nucleicos usando al menos una etapa de centrifugación y/o al menos una etapa de filtración; y
- c. determinar la presencia de microorganismos aislados que tengan ácidos nucleicos.

La presente invención también se refiere a un método para diagnosticar una infección del torrente sanguíneo en un sujeto, que comprende detectar microorganismos de acuerdo a dicho método de detección de microorganismos, tal como se ha descrito anteriormente, donde la presencia de microorganismos es indicativa de una infección asociada a dichos microorganismos.

La presente invención también se refiere a un método para obtener ácidos nucleicos a partir de microorganismos presentes en una muestra sanguínea, método que comprende:

- a. poner en contacto la muestra de sangre con una formulación de saponinas, donde la saponina es una disolución de saponina tratada en autoclave y filtrada (FATS) o una disolución de saponina tratada en autoclave, filtrada y calentada (HFATS) presente en una concentración final de 40 mg/mL a 100 mg/mL;
- b. obtener microorganismos aislados que comprenden ácidos nucleicos; y
- c. lisar los microorganismos aislados para obtener a partir de ellos ácidos nucleicos.

En la presente invención, se ha desarrollado un nuevo método rápido (aproximadamente 30 minutos) para aislar y/o detectar microorganismos y ácidos nucleicos de microorganismos procedentes de muestras sanguíneas. El(los) método(s) de la presente invención comprende(n) (consta(n) de) las etapas de lisar células sanguíneas (hospedantes) a la vez que se protegen (preservan) las células microbianas y sus ácidos nucleicos usando una disolución que comprende saponina en una concentración final que oscila entre 40 y 100 mg/mL; lavar el lisato de células sanguíneas para eliminar una fracción significativa de ácidos nucleicos procedentes de células sanguíneas hospedantes, así como controlar inhibidores de los componentes de la muestra sanguínea a la vez que se preservan las células microbianas y sus ácidos nucleicos; recolectar las células microbianas concentradas y sus ácidos nucleicos y/o extraer ácidos nucleicos microbianos. Esta invención conduce a un método simple que alcanza un aumento de aproximadamente 80 a 500 veces la concentración de células microbianas de la muestra original. El protocolo de concentración y enriquecimiento de esta invención es eficaz para extraer ácidos nucleicos microbianos

de muestras sanguíneas tanto con altas como con bajas cargas microbianas, y es adecuado para un amplio espectro de microorganismos. Este protocolo también es eficaz para obtener células microbianas viables y/o metabólicamente activas.

5 La presente descripción se refiere a un método para aislar microorganismos y/o ácidos nucleicos de microorganismos procedentes de una muestra de sangre que pueda tener, o que se sospeche que tiene, microorganismos y células hospedantes. La muestra de sangre también puede tener, o se puede sospechar que tenga, restos de células hospedantes. El método comprende poner en contacto la muestra sanguínea con una formulación de saponina y/u obtener microorganismos aislados y/o ácidos nucleicos de microorganismos eliminando
10 células hospedantes. Los ácidos nucleicos de microorganismos pueden aislarse adicionalmente lisando los microorganismos aislados.

La presente invención se refiere a un método para detectar microorganismos en una muestra de sangre. El método puede comprender, por ejemplo, amplificar ácidos nucleicos de microorganismos a partir del método de aislamiento de la presente invención. El método puede comprender además detectar ácidos nucleicos de microorganismos
15 amplificados mediante hibridación con una sonda y/o una colección de sondas seleccionadas entre aquellas capaces de unión específica a ácidos nucleicos amplificados de al menos un microorganismo. El método también puede comprender, por ejemplo, analizar la expresión antigénica, la actividad celular y/o la actividad fisiológica de microorganismos obtenidos a partir del método de aislamiento de la presente invención.

20 También se describen en la presente memoria ensayos que pueden basarse en los métodos de aislamiento y/o en los métodos de detección de la presente invención.

También se describe en la presente memoria un kit para aislar microorganismos y/o ácidos nucleicos de
25 microorganismos procedentes de un fluido corporal que puede comprender, o que se puede sospechar que comprende, microorganismos y/o células hospedantes y/o restos de células hospedantes. El kit puede comprender un recipiente que contenga una formulación de saponina. El kit puede comprender además un recipiente que contenga un medio de detección. También se describe en la presente memoria el uso de kits para aislar y/o detectar microorganismos y/o ácidos nucleicos de microorganismos.

30 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar una infección del torrente sanguíneo en un sujeto que lo necesite. El método comprende detectar microorganismos, donde la detección puede ser indicativa de una infección asociada a los microorganismos detectados.

35 En la presente memoria también se describe una formulación de saponina preparada mediante calefacción, filtración y/o autoclavado. En la presente memoria también se describe el uso de dicha formulación de saponina para el aislamiento de microorganismos y/o ácidos nucleicos de microorganismos procedentes de un fluido corporal que puede comprender, o que se puede sospechar que comprende, microorganismos y/o células hospedantes y/o restos de células hospedantes.

40 **Breve descripción de las figuras**

En las figuras, que ilustran ejemplos no limitantes de realizaciones de la presente invención:

45 Figura 1: muestra la recuperación eficaz de células microbianas y sus ácidos nucleicos a partir de muestras sanguíneas contaminadas con 10 CFU/mL de *Enterococcus faecalis*. La detección de ácidos nucleicos microbianos mediante PCR en tiempo real a partir de la muestra sanguínea contaminada tratada con el método de esta invención se comparó con un lisato celular de control preparado directamente a partir de 50 CFU de bacterias no tratadas. La desviación estándar de las muestras sanguíneas contaminadas corresponde a cinco donantes de sangre con un
50 mínimo de diez réplicas por donante, mientras que la desviación estándar para el control es para una única réplica para cada uno de los cinco donantes; y

Figura 2: muestra la detección de ácidos nucleicos de *E. coli* de acuerdo a la concentración final de saponina (método de dos etapas). La eficacia relativa de la detección de *E. coli* se estimó calculando la diferencia entre el
55 valor umbral del ciclo obtenido para una muestra sanguínea tratada con TE 1X y los valores umbrales de ciclo obtenidos para sangre tratada con diferentes rangos de concentraciones de FATS. Las desviaciones estándar de las muestras tratadas con FATS corresponden a 4-10 repeticiones llevadas a cabo sobre al menos tres muestras sanguíneas diferentes tratadas. La detección de ácido nucleico aumenta con la concentración de FATS.

60 **Descripción detallada**

Con el objetivo de proporcionar una comprensión clara y consistente de los términos usados en la presente invención, a continuación se introducen una serie de definiciones. Adicionalmente, a menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos tal como se emplean en la presente memoria tienen el mismo
65 significado utilizado habitualmente por los especialistas en la técnica a la cual pertenece la invención.

Tal como se usa en la especificación y en la(s) reivindicación(es), el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye una variación de error inherente para el dispositivo y/o el método que se esté empleando para determinar el valor. Cuando se enumera explícitamente un valor, debe entenderse que los valores que son aproximadamente la misma cantidad que el valor enumerado también quedan contemplados. El uso de las formas singulares, "un", "uno", "una" y "el", "la", incluyen las referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario.

La presente descripción se refiere a un método para aislar (concentrar) microorganismos (microorganismos viables y/o metabólicamente activos) y/o ácidos nucleicos de microorganismos (por ejemplo, y sin limitación, ADN) procedentes de una muestra de sangre que puede comprender, o que se puede sospechar que comprende, microorganismos y células hospedantes. El método puede comprender (puede constar), por ejemplo, poner en contacto la muestra de sangre con una formulación de saponina y/u obtener microorganismos aislados y/o ácidos nucleicos de microorganismos eliminando células hospedantes y/o restos de células hospedantes. Los ácidos nucleicos de microorganismos pueden aislarse adicionalmente lisando los microorganismos aislados.

Se puede preparar una formulación de saponina resuspendiendo saponinas en una disolución hipotónica y/o fisiológica adecuada. Un ejemplo de fuente de saponinas son las saponinas vegetales derivadas de corteza Molina de *Quillaja saponaria* liberadas de contaminantes de bajo peso molecular. Los ejemplos de disoluciones hipotónicas o fisiológicas incluyen, aunque sin limitación, agua, tampones de baja fuerza iónica tales como TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), tampón de fosfato, disolución salina de tampón de fosfato (1X PBS: NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, y un pH de 7,4), etanol y/o disoluciones acidificadas. Un ejemplo de diluyente hipotónico de la presente invención puede ser el TE 1X a 2X. Un ejemplo de diluyente fisiológico de la presente invención puede ser el PBS 1X. Una suspensión de saponina puede tener una concentración de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 133 mg/mL en el diluyente hipotónico y/o fisiológico.

Una formulación de saponina de la presente descripción es sometida a autoclave, filtrada y/o calentada antes de la filtración. Por ejemplo, calentar la saponina a aproximadamente 95°C puede, por ejemplo, aumentar la disolución. La saponina se puede filtrar, por ejemplo, con un papel de filtro (que incluye por ejemplo papel de filtro del nº 5 de Whatman™) que puede retener la materia particulada no disuelta de mayor tamaño. La saponina también se puede filtrar con una membrana de 5 µm y/o con una membrana de 0,2 µm que puede eliminar material particulado más fino. En un ejemplo de realización de la presente invención, la saponina puede filtrarse usando una membrana de nitrato de celulosa de 5 µm y/o con una membrana de polietersulfona de 0,2 µm.

En un ejemplo de realización de la presente descripción, la saponina es filtrada y autoclavada. Dicho tratamiento da como resultado una formulación de saponina que puede denominarse disolución de saponina filtrada/tratada con autoclave (FATS). En otro ejemplo de realización la saponina se calienta, se filtra y se trata en autoclave. Dicho tratamiento da como resultado una formulación de saponina que puede denominarse disolución de saponina calentada/filtrada/tratada con autoclave (HFATS). En la presente invención se pueden usar las formulaciones FATS y/o HFATS. En la presente invención se puede usar de forma ventajosa la formulación HFATS.

La concentración final de saponina puede ser de 40 mg/mL a 100 mg/mL, de 60 mg/mL a 100 mg/mL, de 75 mg/mL a 100 mg/mL. La concentración final de saponina puede estar entre 40 mg/mL y 50 mg/mL. Tal como se usa en la presente memoria, "concentración final" en relación a la saponina se refiere a la concentración de saponina una vez mezclada con una muestra, por ejemplo, cuando se ha mezclado (o se ha puesto en contacto) con un fluido corporal. Debe entenderse que cualquier rango o grupo especificado es un modo abreviado de referirse a todos los miembros de un rango o grupo de manera individual, así como a todos los posibles subrangos y subgrupos abarcados por los mismos, y de formar similar con respecto a cualesquier subrangos o subgrupos de los mismos. La presente descripción se refiere e incorpora explícitamente todos los miembros específicos y las combinaciones de subrangos o subgrupos de los mismos. Por tanto, por ejemplo, cuando se dice que una concentración final de saponina puede estar por encima de 75 mg/mL, la concentración final de saponina puede ser 75,5 mg/mL, 76 mg/mL, 77 mg/mL, 78 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, etc. En otro ejemplo, cuando se dice que una concentración final de saponina puede estar entre 75 mg/mL y 100 mg/mL, la concentración final de saponina puede ser 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 mg/mL y/o cualquier valor entre medias.

El término "saponina" pretende comprender saponina esteroidea, saponina triterpenoide y/o una combinación de las mismas. En un ejemplo de realización de la presente descripción, la saponina es una saponina triterpenoide.

La formulación de saponina de la presente descripción puede ser compatible con la amplificación de ácidos nucleicos. La formulación de saponina de la presente invención puede conducir de manera selectiva a la lisis de células hospedantes de fluidos corporales en un fluido corporal que puede comprender y/o que se puede sospechar que comprende microorganismos y/o células hospedantes, a la vez que se preserva la integridad y/o la viabilidad de los microorganismos.

Tal como se usa en la presente memoria, un "fluido corporal" es sangre. En un ejemplo de realización, el fluido corporal (muestra) puede obtenerse a partir de un mamífero tal como un ser humano.

La muestra de sangre se puede poner en contacto al menos una vez con la formulación de saponina. En un ejemplo de realización de la presente invención, la muestra sanguínea puede ponerse en contacto una vez con la formulación de saponina (método de una etapa). En otro ejemplo de realización de la presente invención, la muestra sanguínea puede ponerse en contacto dos veces con la formulación de saponina (método de dos etapas). El contacto de la formulación de saponina con la muestra sanguínea puede dar como resultado más de un 80%, más de un 85% y/o más de un 90% de lisis de células hospedantes sanguíneas.

Los microorganismos de la presente descripción pueden ser bacterias, levaduras, hongos y/o una combinación de los mismos. Los microorganismos de la presente invención pueden ser aeróbicos y/o anaeróbicos. Los términos "microorganismos", "células microbianas" y "microbios" pueden usarse de manera indistinta en el presente texto. En un ejemplo de realización, los microorganismos producen infecciones del torrente sanguíneo. Los microorganismos de la presente invención también pueden ser microorganismos causantes de sepsis, es decir, microorganismos tales como bacterias, levaduras y/u hongos que conducen a un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, del inglés "systemic inflammatory response syndrome").

Los microorganismos de la presente descripción incluyen, aunque sin limitación, el género *Acinetobacter*, el género *Bacteroides*, el género *Burkholderia*, el género *Capnocytophaga*, el género *Clostridium*, el género *Corynebacterium*, el género *Citrobacter*, el género *Enterobacter*, el género *Enterococcus*, el género *Escherichia*, el género *Haemophilus*, el género *Klebsiella*, el género *Proteus*, el género *Pseudomonas*, el género *Serratia*, el género *Staphylococcus*, el género *Stenotrophomonas*, el género *Streptococcus*, el género *Aspergillus* y/o el género *Candida*.

Los ejemplos de microorganismos pueden ser *Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides fragilis*, *Burkholderia cepacia*, *Capnocytophaga canimorsus*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium jeikeium*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y/o *Candida tropicalis*.

En un ejemplo de realización, los microorganismos aislados obtenidos mediante el método de la presente invención pueden ser viables y/o son activos metabólicamente. Los "microorganismos viables" son microorganismos que pueden ser capaces de sufrir división celular. Los "microorganismos activos metabólicamente" son microorganismos que pueden realizar funciones metabólicas pero que pueden no ser capaces de sufrir división celular.

El aislamiento de microorganismos y de ácidos nucleicos de microorganismos según el método de la presente invención puede dar como resultado una concentración de los microorganismos y ácidos nucleicos de microorganismos de entre 80 y 500 veces respecto a la muestra sanguínea. Los microorganismos pueden estar presentes en concentraciones bajas y/o altas en un fluido corporal. Habitualmente, las concentraciones de microorganismos en fluidos corporales pueden medirse mediante recuentos de CFU que expresan el número de células microbianas viables por mililitro. Un ejemplo de baja concentración de microorganismos en un fluido corporal puede ser de 10 CFU/mL o menos. Por ejemplo, y sin limitación, una concentración baja de microorganismos puede ser de 0,1 a 10 CFU/mL y cualquier rango entre medias, o incluso inferior. Un ejemplo de alta concentración de microorganismos en un fluido corporal puede ser de 100 a 10.000 CFU/mL o más.

El método de la presente descripción puede tener una sensibilidad analítica de aproximadamente 50 CFU/mL, aproximadamente 40 CFU/mL, aproximadamente 30 CFU/mL, aproximadamente 25 CFU/mL y/o menos. Por ejemplo, la sensibilidad analítica puede estar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 CFU/mL.

Según la presente invención, los microorganismos aislados y/o los ácidos nucleicos de microorganismos aislados pueden estar sustancialmente libres de inhibidores de la amplificación y/o la detección. Según la presente invención, los "inhibidores de amplificación" pueden ser cualquier sustancia que impida y/o evite la amplificación de una secuencia diana.

Según la presente descripción, las células hospedantes pueden ser cualesquier células endógenas de un hospedante dado, por ejemplo un mamífero tal como un humano. Las células hospedantes (células endógenas) pueden estar presentes en una muestra sanguínea. Los ejemplos de células hospedantes de una muestra sanguínea pueden ser glóbulos rojos y glóbulos blancos.

La eliminación de células hospedantes y/o restos de células hospedantes puede implicar lavar la sangre (muestra) concentrando el material insoluble y resuspendiendo dicho material insoluble en una disolución de lavado adecuada. Las etapas de lavado de concentración y resuspensión de material insoluble pueden repetirse un número de veces, por ejemplo, para maximizar la eliminación de inhibidores de los métodos de amplificación/detección de ácidos nucleicos. Los métodos de concentración pueden incluir, sin limitación, centrifugación, filtración, unión superficial y/o

atrapamiento magnético, etc. Los ejemplos de disoluciones de lavado adecuadas pueden incluir, sin limitación, agua, tampones tales como TE, tampón de fosfato, tampón Tris, salino tamponado con fosfato, salino tamponado con Tris, disoluciones acuosas que contengan etanol y/o disoluciones acidificadas, etc.

5 Los microorganismos aislados pueden ser lisados (por ejemplo mediante lisis química, enzimática y/o mecánica) para extraer y/o purificar sus ácidos nucleicos empleando cualesquier medios conocidos por el especialista en la técnica. Un ejemplo de método de extracción de ácidos nucleicos puede ser el kit BD GeneOhm™ Lysis (BD Diagnostics-GeneOhm).

10 La presente invención también se refiere a un método para detectar microorganismos en una muestra de sangre. El método de detección puede comprender (puede consistir en), por ejemplo, amplificar los ácidos nucleicos de microorganismos obtenidos a partir del método de aislamiento de la presente invención. El método puede comprender además la detección de ácidos nucleicos de microorganismo amplificados. El método además puede comprender, por ejemplo, analizar la expresión antigénica fenotípica, la actividad celular y/o la actividad fisiológica de microorganismos obtenidos a partir del método de aislamiento de la presente invención. Los análisis de expresión antigénica fenotípica, celulares y/o fisiológicos de células microbianas pueden llevarse a cabo por cualquier método conocido por el especialista en la técnica.

20 Según la presente descripción, "amplificación" significa un aumento del número de una secuencia de ácido nucleico particular y puede realizarse a través de una serie de técnicas de amplificación de ácido nucleico *in vitro* conocidas en la técnica. Las técnicas de amplificación pueden incluir métodos que requieran ciclos de temperatura (tal como PCR, reacción en cadena de ligasa, amplificación basada en la transcripción) y/o sistemas de amplificación isoterma (tales como la replicación de secuencia autosostenida, el sistema de replicasa, el sistema de helicasa, la amplificación de desplazamiento de cadena, la amplificación basada en círculo enrollado y NASBA). Según un ejemplo de realización de la presente invención, la amplificación de ácidos nucleicos de microorganismos se puede llevar a cabo mediante reacción en cadena de polimerasa y/o cualquiera de sus variantes, que incluyen, sin limitación, PCR específica de alelo, PCR asimétrica, PCR de inicio caliente, PCR específica de intersecuencia, PCR específica de metilación, PCR de minicebador, amplificación de sonda dependiente de ligación multiplex, PCR multiplex, PCR anidada, PCR cuantitativa, PCR de transcripción inversa y/o PCR de aterrizaje. La amplificación se puede llevar a cabo usando cebadores y/o una colección de cebadores que pueden seleccionarse entre aquellos capaces de unirse específicamente a ácidos nucleicos de al menos un microorganismo. Los ácidos nucleicos de microorganismo amplificados pueden ser detectados hibridándolos con una sonda y/o una colección de sondas capaces de unirse específicamente a ácidos nucleicos amplificados de al menos un microorganismo. Los ejemplos de cebadores y sondas usados en la presente invención pueden ser las SEQ ID NO: 1 a 32.

35 También se describen en la presente memoria ensayos que pueden basarse en los métodos de aislamiento y/o en los métodos de detección de la presente invención.

40 También se describe en la presente memoria un kit para aislar microorganismos y/o ácidos nucleicos de microorganismos procedentes de un fluido corporal que puede comprender, o que se puede sospechar que comprende, microorganismos y/o células hospedantes y/o restos de células hospedantes. El kit puede comprender un recipiente que contenga una formulación de saponina y/o un recipiente que contenga un medio de detección. También se describe en la presente memoria el uso de dichos kits para aislar y/o detectar microorganismos y/o ácidos nucleicos de microorganismos. Un kit también puede comprender instrucciones para su uso.

45 Según la presente descripción, el medio de detección puede consistir, por ejemplo, en cebadores capaces de unirse específicamente a ácidos nucleicos de al menos un microorganismo, sondas capaces de unirse específicamente a ácidos nucleicos de al menos un microorganismo, medios de detección de análisis de fenotipo, medios de detección de análisis de expresión antigénica, medios de detección de actividad celular y/o medios de detección de actividad fisiológica.

50 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar una infección del torrente sanguíneo en un sujeto que lo necesite. El método comprende detectar microorganismos, donde la detección puede ser indicativa de una infección asociada a los microorganismos detectados. Tal como se usa en la presente memoria, un sujeto que lo necesite puede ser un sujeto que tenga, o que se sospeche o que esté en riesgo de tener, una infección del torrente sanguíneo. En un ejemplo de realización de la invención, un sujeto es un mamífero tal como un ser humano.

60 En la presente memoria también se describe una formulación de saponina preparada mediante calefacción, filtración y/o tratamiento en autoclave. En la presente memoria también se describe el uso de dicha formulación de saponina para el aislamiento de microorganismos y/o ácidos nucleicos de microorganismos procedentes de un fluido corporal que puede comprender, o que se puede sospechar que comprende, microorganismos y/o células hospedantes y/o restos de células hospedantes.

65 La formulación de saponina según la presente invención puede usarse en una concentración final de entre 40 mg/mL y 100 mg/mL. La formulación de saponina puede usarse en una concentración final de más de 75 mg/mL.

La presente descripción también se refiere a un método para detectar microorganismos y/o ácidos nucleicos de microorganismos procedentes de una muestra de sangre que pueda comprender, o que se sospeche que comprende, microorganismos y células hospedantes. El método puede comprender la etapa de a. lisar células hospedantes usando una formulación de saponina, b. separar los microorganismos de las células hospedantes lisadas, c. lavar los microorganismos separados y/o d. recolectar los microorganismos. El método puede comprender además las etapas de e. extraer ácidos nucleicos de los microorganismos y/o f. detectar los microorganismos y/o los ácidos nucleicos de microorganismos.

La aplicabilidad de la presente invención será evidente a partir de los ejemplos mostrados a continuación.

Ejemplos

EJEMPLO 1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

El(los) método(s) de la presente invención comprende(n) las etapas de lisar células sanguíneas (por ejemplo, más del 90% de las células sanguíneas) a la vez que se protegen las células microbianas y sus ácidos nucleicos usando una disolución que puede comprender saponina tratada en una concentración final que oscila entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 mg/mL; lavar el lisato de células sanguíneas para eliminar una fracción significativa de ácidos nucleicos procedentes de células sanguíneas, así como controlar inhibidores de los componentes de la sangre a la vez que se preservan las células microbianas y sus ácidos nucleicos; recolectar las células microbianas concentradas y sus ácidos nucleicos y/o extraer ácidos nucleicos microbianos. Para dicho propósito, se usan las siguientes condiciones y/o reactivos.

Preparación de reactivo de saponina

El reactivo de saponina se preparó resuspendiendo saponinas en forma de extracto en polvo procedente de corteza de *Quillaja saponaria* Molina en una disolución hipotónica o fisiológica adecuada. Los extractos de saponina de corteza de *Quillaja saponaria*, limpios de contaminantes de bajo peso molecular, procedían de Sigma-Aldrich (nº de catálogo S4521). La saponina se prepara disolviendo entre 100 y 133 mg de polvo por mL de diluyente de tampón TE o de PBS.

Etapas de preparación de la formulación de saponina "FATS"

1) Se mezcla el polvo de saponina con TE 1X ó con PBS 1X;

2) se disuelve la saponina mezclando a temperatura ambiente durante varias horas;

3) la disolución de saponina es filtrada secuencialmente a través de un filtro de papel del nº5 (Whatman™), un filtro de membrana de nitrato de celulosa de 5 µm (Whatman™) y un filtro de membrana de polietersulfona de 0,2 µm (Nalgene); y

4) la disolución filtrada se somete a autoclave a 121°C durante 30 minutos y se almacena a 4°C.

Etapas de preparación de la formulación de saponina "HFATS"

1) Se mezcla el polvo de saponina con TE 1X ó con PBS 1X;

2) la disolución de saponina se calienta a 95-100°C con agitación hasta obtener una disolución completa;

3) la disolución de saponina caliente es filtrada secuencialmente a través de un filtro de papel del nº5 (Whatman™), un filtro de membrana de nitrato de celulosa de 5 µm (Whatman™) y un filtro de membrana de polietersulfona de 0,2 µm (Nalgene); y

4) la disolución filtrada se somete a autoclave a 121°C durante 30 minutos y se almacena a 4°C.

Siempre que sea posible, para minimizar los niveles de contaminación de ácidos nucleicos debidos a los reactivos y disoluciones, las disoluciones de partida se filtran con membranas de polietersulfona de 0,1 µm (Pall). Además de la filtración con 0,1 µm, las disoluciones de agua, TE, PBS y otras disoluciones térmicamente estables fueron sometidas a autoclave.

Condiciones de lisis celular

Método de dos etapas

El primer tratamiento de FATS ó HFATS se lleva a cabo añadiendo el equivalente a aproximadamente 3 volúmenes de sangre de FATS ó HFATS a una concentración de 100 mg/mL con una muestra de sangre para una

concentración final de FATS o HFATS de 75 mg/mL. La muestra de sangre se mezcla con FATS o HFATS durante 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. Este primer tratamiento de FATS ó HFATS va seguido de una centrifugación a 10.000 g durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y la partícula obtenida se vuelve a suspender con el equivalente de aproximadamente 2 volúmenes de sangre de FATS ó HFATS a una concentración de 100 mg/mL. Para este segundo tratamiento, la concentración final de FATS ó HFATS es de 100 mg/mL. La muestra de sangre se mezcla con FATS o HFATS durante 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. Este segundo tratamiento de FATS ó HFATS va seguido de una centrifugación a 10.000 g durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y la partícula obtenida se lava como se describe a continuación.

10 Método de una etapa

Un método alternativo es tratar una muestra de sangre usando un tratamiento único con FATS ó HFATS. La muestra sanguínea se mezcla directamente con aproximadamente de 4 a 5 volúmenes de sangre de FATS ó HFATS a una concentración de 100 mg/mL para lisar glóbulos rojos y glóbulos blancos para una concentración final de FATS ó HFATS equivalente a 80-83,3 mg/mL. Este tratamiento de HFATS va seguido de una centrifugación a 10.000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se desecha y la partícula obtenida se lava como se describe en el siguiente párrafo.

20 Lavados de la partícula obtenida

Los ejemplos de disoluciones de recolección y lavado adecuadas pueden incluir, sin limitación, agua, tampones tales como TE, tampón de fosfato, tampón Tris, salino tamponado con fosfato, salino tamponado con Tris, disoluciones acuosas que contenga etanol y/o disoluciones acidificadas, etc. El lavado y la recolección de células microbianas y de sus ácidos nucleicos puede realizarse mediante una agitación vigorosa de la disolución de lavado/recuperación con la partícula resultante de las etapas previas. Un ejemplo de disolución de lavado/recolección puede ser el tampón TE 1X ó el tampón PBS 1X. Los lavados se llevan a cabo mediante ruptura mecánica de la partícula con un pipeteo hacia arriba y hacia abajo, seguido de mezclamiento durante 10 segundos con un vórtex fijado a máxima velocidad. Posteriormente, la disolución se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto, y se desechó el sobrenadante. La partícula se puede lavar una vez o más, por ejemplo, la partícula se puede lavar dos veces.

30 Etapa de recolección

La partícula lavada contiene células microbianas y sus ácidos nucleicos (también puede contener residuos de células sanguíneas). Para recolectar las células microbianas y sus ácidos nucleicos, la partícula lavada se agita vigorosamente en una disolución de lavado/recolección adecuada tal como TE 1X durante 15 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. El volumen de TE 1X representa el 0,002-0,012X del volumen inicial de sangre. De este modo se alcanza un aumento de la concentración de las células microbianas y sus ácidos nucleicos de 80 a 500 veces el valor inicial.

La partícula final no alterada se elimina mecánicamente del tubo mediante separación mecánica usando una punta de micropipeta. La suspensión restante de células microbianas y ácidos nucleicos está preparada entonces para la extracción de ácidos nucleicos. La partícula lavada también puede seguir siendo procesada para obtener células microbianas. La disolución de lavado y de recolección liberada de la partícula puede seguir siendo procesada para extraer ácidos nucleicos microbianos. La disolución de lavado y de recolección liberada de la partícula también puede seguir siendo procesada para obtener células microbianas. En cualquier etapa tras la lisis celular de la sangre mediante disolución HFATS y/o FATS, se puede usar una muestra de las suspensiones de células microbianas y ácidos nucleicos para realizar análisis fenotípicos, de expresión antigénica, celulares y/o fisiológicos.

Según se determina a través de un clasificador celular activado por fluorescencia (EPICS XL, Beckman Coulter), se puede alcanzar una lisis de más del 90% de los glóbulos rojos y blancos usando el método de una etapa con HFATS.

Una persona especialista en la técnica conoce los medios de desplazamiento de fluidos, así como otros modos de alcanzar la separación y la recolección de fracciones solubles e insolubles. Por tanto, se contemplan medios, modos y dispositivos alternativos diseñados para mover fluidos, y/o separar y/o recuperar fracciones solubles e insolubles, tanto manuales como automatizados.

Control de inhibidores de PCR

Los inhibidores potenciales de PCR presentes en extractos de ADN se pueden monitorizar añadiendo una cantidad de control de ADN diana a la mezcla de PCR. Dicho control se puede llevar a cabo en el mismo tubo de reacción o en paralelo (Hoorfar et al., 2004, Lett. Appl. Microbiol., 38: 79-80).

65 EJEMPLO 2 - AISLAMIENTO EFICAZ Y DETECCIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS Y SUS ÁCIDOS NUCLEICOS EN MUESTRAS SANGUÍNEAS

Se inocularon 5 mL de muestra de sangre entera con un promedio de 10 CFU/mL de *Enterococcus faecalis*. La sangre contaminada fue tratada con saponina usando el método de dos etapas descrito en el Ejemplo 1. Durante la primera etapa, se añadieron 15 mL de HFATS 100 mg/mL en TE 1X a la muestra de sangre contaminada y se mezcló durante 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. Los residuos de sangre y de células microbianas se obtuvieron en forma de partícula mediante centrifugación a 10.000 g durante 5 minutos, y el sobrenadante fue descartado. En una segunda etapa, se añadieron 10 mL de HFATS 100 mg/mL en TE 1X a la partícula recogida y se mezcló 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad, a continuación se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos y el sobrenadante fue descartado.

La partícula se lavó en 1,7 mL de PBS 1X mediante pipeteo arriba y abajo. La suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. La etapa de lavado se repitió una vez. Se añadieron 50 µL de TE 1X a la partícula lavada. La partícula lavada y el TE 1X fueron agitados vigorosamente durante 15 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. Se retiró la partícula usando una punta de micropipeta y la fase acuosa se transfirió a un tubo que contenía bolitas de vidrio para lisis de células microbianas usando el kit de Lisis de BD GeneOhm™.

Se detectaron ácidos nucleicos de *E. faecalis* con un ensayo de PCR desarrollado usando el aparato de amplificación de ADN rápida SmartCycler™ (Cepheid). Este ensayo incorpora cebadores específicos de las secuencias de gen tuf de *E. faecalis* (5'-ACTTGTCCACGTTSGATRTCT-3', SEQ ID NO: 1 y 5'-AATTAATGGCTGCWGGTTGAYGAA-3', SEQ ID NO: 2) y detecta los amplicones generados con una sonda TaqMan específica del gen tuf de *E. faecalis* (5'-ATCCCAACTCCAGAACGTGAYA-3', SEQ ID NO: 3). Se llevaron a cabo reacciones PCR usando tampón de reacción 1X PCR (Promega) (tampón 1X es Tris-HCl 10 mM a pH 9,1, KCl 50 mM, 3,3 mg/mL de BSA, 0,1% de Triton™ X-100 y MgCl₂ 2,5 mM), 0,4 µM de cada cebador, 0,1 µM de la sonda TaqMan, 0,2 mM de la mezcla de los cuatro trifosfatos de dinucleótido (GE Healthcare) y 0,025 U/µL de ADN polimerasa Taq (Promega), acoplado al anticuerpo TaqStart® (Clontech Laboratories). Las condiciones de ciclos de PCR, usando un SmartCycler™ (Cepheid), fueron las siguientes: 3 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial, y después 45 ciclos de 10 segundos a 95°C para desnaturalización, 30 segundos a 58°C para maduración y 30 segundos a 72°C para extensión.

La detección de ácidos nucleicos microbianos mediante PCR en tiempo real en muestras de sangre contaminadas tratadas con el método de esta invención se comparó con un lisato de células microbianas de control preparado directamente a partir de 50 CFU de bacterias no tratadas suspendidas en TE 1X, usando el kit de lisis BD GeneOhm™ (FIGURA 1). El recuento inicial de CFU/mL se determinó cultivando diluciones en serie en PBS 1X y llevándolas a placa sobre un medio sólido. Se confirmó la correspondencia entre las CFU y el equivalente de copia genómica usando una curva de calibrado con diluciones de ADN genómico de *E. faecalis* purificado. El recuento en placa confirmó que se había evaluado un rango de 8 a 12 CFU/mL para estos ensayos, correspondiente a entre 2 y 3 CFU por reacción de PCR. Los resultados mostraron que se obtienen valores umbral de ciclo análogos para el lisato celular no tratado de control y la muestra de sangre contaminada, lo que indica que el método de la presente invención es altamente efectivo para recuperar células microbianas y sus ácidos nucleicos.

EJEMPLO 3 - EFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE SAPONINA EN LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE *E. COLI*

Se monitorizó el efecto de concentraciones crecientes de disolución de saponina tratada autoclavada filtrada (FATS) en la detección de ácidos nucleicos de *E. coli*. Se recuperó ADN de microorganismos de los especímenes sanguíneos contaminados con células microbianas vivas. Se inocularon 10 mL de muestra de sangre entera con un promedio de 400 CFU de *E. coli* por mL. El recuento inicial de CFU/mL se determinó cultivando diluciones en serie en PBS 1X en medio sólido. Este ensayo se completó usando el tratamiento de dos etapas con FATS descrito en el Ejemplo 1. Durante la primera etapa, se añadieron 40 mL de FATS en TE 1X a la muestra de sangre contaminada y se mezcló durante 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. Se obtuvo una partícula por centrifugación a 10.000 g durante 5 minutos, y se desechó el sobrenadante. En una segunda etapa, se añadieron 45 mL de FATS en TE 1X a la partícula y se mezcló durante 10 segundos usando el vórtex fijado a la máxima velocidad. Posteriormente, la disolución se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos, y se desechó el sobrenadante. La partícula se lavó una vez en 500 µL de TE 1X mediante pipeteo arriba y abajo. A continuación la disolución se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos, y se desechó el sobrenadante. Las células microbianas y sus ácidos nucleicos presentes en la partícula lavada fueron resuspendidos en 20 µL de TE 5X. La lisis mecánica de las células microbianas y la extracción de sus ácidos nucleicos se logró usando el kit de lisis BD GeneOhm™ (BD Diagnostics-GeneOhm). El lisato resultante que contenía los ácidos nucleicos microbianos se precipitó rápidamente por centrifugación y se calentó a 95°C durante 2 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante. De igual manera, se trataron 5 mL de muestra de sangre entera con 35 CFU de *E. coli* por mL con 20 mL de HFATS usando el método de una etapa.

Se detectaron ácidos nucleicos de *E. coli* con un ensayo de PCR desarrollado usando el aparato de amplificación de ADN rápida SmartCycler™ (Cepheid). Este ensayo incorpora cebadores específicos de las secuencias de gen tuf de *E. coli* (5'-TGGGAAGCGAAAATCCTG-3', SEQ ID NO: 4 y 5'-CAGTACAGGTAGACTTCTG-3', SEQ ID NO: 5) y detecta los amplicones generados con una sonda TaqMan específica del gen tuf de *E. coli* (5'-

AACTGGCTGGCTTCCTGG-3', SEQ ID NO: 6). Se llevaron a cabo reacciones de PCR en una mezcla de 25 µL que contenía 13 µL de lisato que comprende los ácidos nucleicos concentrados procedentes de las células microbianas, 1X tampón de reacción PCR (Promega) (1X tampón es Tris-HCl 10 mM a pH 9,1, KCl 50 mM, 3,3 mg/mL de BSA, 0,1% de Triton™ X-100 y MgCl₂ 2,5 mM), 0,4 µM de cada cebador, 0,1 µM de la sonda TaqMan, 0,2 mM de la mezcla de los cuatro trifosfatos de dinucleótido (GE Healthcare) y 0,025 U/µL de ADN polimerasa Taq (Promega), acoplado al anticuerpo TaqStart® (Clontech Laboratories). Las condiciones de ciclos de PCR fueron las siguientes: 2 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial, y después 45 ciclos de 1 segundos a 95°C para desnaturalización, 30 segundos a 58°C para maduración y 30 segundos a 72°C para extensión.

Tal como se muestra en la FIGURA 2, la detección de ácidos nucleicos de *E. coli* aumenta la concentración de FATS. La detección de ácidos nucleicos de *E. coli* aumentó en 60-100 mg/mL de concentración final de FATS. De manera similar, la detección de ácidos nucleicos de microorganismos aumentó con la concentración de HFATS. La detección de ácidos nucleicos de microorganismos fue optimizada alrededor de aproximadamente 80 mg/mL de HFATS. Tal como se muestra en la TABLA 1, la correlación de la detección de ácidos nucleicos de *E. coli* con el aumento de la concentración de FATS se asocia a una reducción del volumen de partícula de sangre. Esta reducción del volumen de partícula residual comienza a aproximadamente 40 mg/mL de FATS. Con HFATS, el volumen de partícula residual es consistentemente pequeño (equivalente al obtenido con 60-100 mg/mL de FATS), incluso a las menores concentraciones de HFATS. Considerando que los experimentos de control mostraron que las partículas más pequeñas parecen facilitar la recolección de células microbianas y de sus ácidos nucleicos, de forma ventajosa se pueden usar concentraciones de saponina de aproximadamente 75 mg/mL o más.

TABLA 1 - INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SAPONINA EN EL TAMAÑO DE PARTÍCULA LAVADA

	FATS (mg/mL) con espécimen de sangre							
	0-0	8-10	16-20	24-30	32-40	40-50	60-75	80-100
Volumen de partícula (µL)	100	50-75	50-75	50-75	30-50	30-50	20-40	10-20

EJEMPLO 4 - DETECCIÓN DE UNA VARIEDAD DE ESPECIES BACTERIANAS Y FÚNGICAS

La detección de una variedad de microorganismos bacterianos y fúngicos fue evaluada mediante PCR tras su recuperación a partir de especímenes de sangre contaminados tratados usando los métodos de esta invención (métodos de una etapa o de dos etapas). Se inocularon 5 mL de sangre entera con una suspensión celular de bacterias o levadura. El método de dos etapas se procesó como se indica a continuación. Se añadieron 15 mL de HFATS 100 mg/mL en TE 1X a la muestra de sangre contaminada y se mezcló durante 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. Posteriormente, la disolución se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos, y se desechó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 10 mL de HFATS 100 mg/mL en TE 1X a la partícula y se mezcló durante 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. A continuación la disolución se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos, y se desechó el sobrenadante. El método de una etapa se procesó como se indica a continuación. Se añadieron 20 mL de HFATS a 100 mg/mL en TE 1X a la sangre contaminada y se mezcló durante 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. Posteriormente, la disolución se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos, y se desechó el sobrenadante. La partícula se lavó dos veces. Se añadieron 50 µL de TE 1X a la partícula lavada. La partícula lavada y el TE 1X fueron agitados vigorosamente durante 15 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. La partícula se retiró usando una punta de micropipeta. La suspensión remanente que contenía células microbianas fue lisada mecánicamente con bolitas de vidrio para extraer los ácidos nucleicos microbianos. Para cada diana de especie microbiana añadida a los especímenes de sangre, se evaluó un donante de sangre con un mínimo de 2 réplicas. Los ácidos nucleicos fueron detectados usando ensayos PCR multiplex en un termociclador Rotor-Gene™ (Corbett Life Science). Dichos ensayos PCR multiplex incorporan cebadores específicos de las secuencias génicas *tuf*, *recA* y/o *tef1*, tal como se muestran en la TABLA 2.

TABLA 2 - LISTA DE CEBADORES Y SONDAS DE AMPLIFICACIÓN SELECCIONADOS

Combinaciones de cebadores/sondas	SED ID NO.	Secuencia	Especie diana o fuente
<i>E. faecalis</i>	1	ACTTGTCCACGTTSGATRTCT	<i>Enterococcus faecalis</i>
	2	AATTAATGGCTGCWGTTGAYGAA	<i>Enterococcus faecalis</i>
	3	ATCCCAACTCCAGAACGTGAYA	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. coli</i>	4	TGGGAAGCGAAAATCCTG	<i>Escherichia coli</i>
	5	CAGTACAGGTAGACTTCTG	<i>Escherichia coli</i>

ES 2 531 455 T3

Combinaciones de cebadores/sondas	SED ID NO.	Secuencia	Especie diana o fuente
	6	AACTGGCTGGCTTCCTGG	<i>Escherichia coli</i>
Multiplex nº1	7	ACTGGYGTGAIATGTTCCGYAA	Amplio espectro *
	8	ACGTCAGTGTACGGAARTAGAA	Amplio espectro *
	9	ACAGGTGTTGAAATGTTCCGTAA	<i>Enterococcus faecalis</i>
	10	ACGTCTGTTGTACGGAAGTAGAA	<i>Enterococcus faecalis</i>
	11	CAGGAATCGAAATGTTCCAGAAAG	<i>Clostridium perfringens</i>
	12	ACGTCTGTTGTTCTGAAGTAGAA	<i>Clostridium perfringens</i>
	13	ACCTCCATCGAGATGTTCAACAA	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
	14	GGTGGTGC GGAAGTAGAA	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
	15	ACAGGAGTTGAGATGTTCCGTAA	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>
	16	ACGTCAGTTGTACGAACATAGAA	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>
Multiplex nº2	17	GGTWGTIGCTGCGACTGACGG	Amplio espectro *
	18	TCAATCGCACGCTCTGGTTC	Amplio espectro *
	19	AACGTGGTCAAGTWTTAGC	<i>Staphylococcus sp.</i>
	20	GTACGGAARTAGAATTGWGG	<i>Staphylococcus sp.</i>
	21	GTGGRATIGCIGCCTTTATCG	<i>Streptococcus sp.</i>
	22	ATIGCCTGRCTCATCATACG	<i>Streptococcus sp.</i>
Multiplex nº3	23	CAAGATGGAYTCYGYAAITGGGA	<i>Candida sp.</i>
	24	CATCTTGCAATGGCAATCTCAATG	<i>Candida sp.</i>
	25	CATCTTGTAATGGTAATCTTAATG	<i>Candida krusei</i>
	26	GTTCCAGACYICCAAGTATGAG	<i>Aspergillus sp.</i>
	27	ATTCGTTGTAACGATCCTCGGA	<i>Aspergillus sp.</i>
	28	GATTCGTTGTAACGATCCTGAGA	<i>Aspergillus flavus</i>
	29	ATTCGTTGTAACGGTCCTCAGA	<i>Aspergillus terreus</i>
Multiplex nº4	30	TGATGCCGRTIGAAGACGTG	Amplio espectro *
	31	AGYTTGCGGAACATTTCAAC	Amplio espectro *
	32	GTGGGAAGCGAAAATCCTG	<i>Escherichia coli + Shigella sp.</i>

* Los cebadores de amplio espectro fueron elegidos por su capacidad para amplificar muchas especies bacterianas.

Según la *International Union of Biochemistry* (IUB), se han usado los siguientes códigos de una letra para las bases de nucleótidos: A: Adenina (A), C: Citosina (C), G: Guanina (G), T: Timina (T), U: Uridina (U), e I: Inosina (I). La inosina es una base modificada que puede unirse con cualquiera de las bases regulares (A, T, C o G). La inosina se usa con el objetivo de minimizar el número de degeneraciones de un oligonucleótido. Para las degeneraciones de secuencia, los códigos IUB son M: Adenina o Citosina (A o C), R: Adenina o Guanina (A o G), W: Adenina o Timina (A o T), S: Citosina o Guanina (C o G), Y: Citosina o Timina (C o T), y K: Guanina o Timina (G o T).

Las secuencias de oligonucleótidos de cebadores o sondas pueden derivar de cualquiera de las cadenas del ADN dúplex diana. Los cebadores o sondas pueden consistir en las bases A, G, C ó T ó análogos, y pueden estar degeneradas en una o más posiciones de nucleótidos elegidas para asegurar la amplificación de ADN para todas las cepas de una especie diana de bacterias y/u hongos. Los cebadores degenerados son cebadores que tienen una serie de posibilidades de posiciones no coincidentes en la secuencia con el objetivo de permitir la maduración con

secuencias complementarias y la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas. Por ejemplo, el siguiente cebador AYATTAGTGCTTTTAAAGCC es una mezcla equimolar de los cebadores ACATTAGTGCTTTTAAAGCC y ATATTAGTGCTTTTAAAGCC. Las degeneraciones reducen la especificidad de el(los) cebador(es), lo que significa que las oportunidades de discrepancia son mayores, y el ruido de fondo aumenta; asimismo, un aumento de la degeneración significa que la concentración de los cebadores individuales disminuye; por tanto, preferiblemente se evita una degeneración superior a 512 veces. Por tanto, los cebadores degenerados deberían diseñarse cuidadosamente a fin de evitar afectar a la sensibilidad y/o la especificidad del ensayo. Se han diseñado varios cebadores para amplificar de forma eficiente los patógenos descritos en la presente memoria. Cada uno de los oligonucleótidos individuales tiene su propia utilidad; puede ser posible usar dichos oligonucleótidos para otros propósitos diferentes a los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los cebadores usados en la presente invención pueden combinarse con otros cebadores para la amplificación de un amplicón más largo o más corto; las sondas usadas en la presente invención pueden combinarse con otras sondas.

Se llevaron a cabo ensayos de PCR para determinar la detección de las especies seleccionadas a bajas concentraciones de células microbianas. Las reacciones PCR se llevaron a cabo en una mezcla de 25 µL que contenía 2,5 µL de lisato con los ácidos nucleicos concentrados, 1X tampón PC2 (Ab Peptides) (1X PC2 es Tris-HCl 50 mM a pH 9,1, (NH₄)₂SO₄ 16 mM, MgCl₂ 3,5 mM, 0,150 mg/mL de albúmina de suero bovino), de 0,4 a 1,2 µM de cada uno de los cebadores (la concentración óptima de cada cebador se ajustó para asegurar el máximo rendimiento de amplificación), 0,2 mM de la mezcla de los cuatro trifosfatos de dinucleótido (dNTPs) (GE Healthcare) y de 0,05 a 0,06 U/µL de ADN polimerasa KlenTaq1™ (Ab Peptides), acoplada con anticuerpo TaqStart® (Clontech Laboratories). La mezcla de reacción PCR se suplementó con MgCl₂ (Promega) de tal modo que la concentración final de cloruro de magnesio fue de 4,5 mM, y con la fracción V (Sigma) de albúmina de suero bovino (BSA) de tal modo que la concentración final de BSA fue de 2,15 mg/mL. Asimismo, se añadió 8-metoxipsoralen (8-Mop) (Sigma) a la mezcla madre de reacción a una concentración de 0,13 µg/µL y se expuso a iluminación UV en un Spectrolinker™XL-1000 (Spectronics Corp.) entre 9999 y 40.000 µJ/cm² con el objetivo de controlar la contaminación de ADN. La exposición a UV se ajustó según el nivel de contaminación de los diferentes lotes de reactivos, tal como se describe en el documento WO03087402. Para la detección post-PCR de amplicones mediante análisis de curva de fusión, la mezcla de PCR descrita antes se suplementó con 1x SYBR® Green (Molecular Probes), y se determinaron las diferentes temperaturas de fusión de los amplicones según las instrucciones proporcionadas por el fabricante del termociclador. Las condiciones de termociclo usando el aparato Rotor-Gene™ fueron 1 minuto a 95°C, para la desnaturalización inicial, y a continuación 40 ciclos de 1 segundo a 95°C para desnaturalización, 10 segundos a 60°C para maduración, y 20 segundos a 72°C para extensión. Los amplicones fueron fundidos usando un rango de temperaturas de 60° a 95°C.

Tal como se muestra en la TABLA 3, la sensibilidad analítica osciló entre 1 y 47 CFU/mL (para el método de una etapa) o entre 1 y 25 CFU/mL (para el método de dos etapas). La sensibilidad analítica también dependió de las especies diana de bacterias u hongos añadidas a las muestras sanguíneas.

Cuando se compara el método de la presente invención con datos publicados para 24 especies microbianas cubiertas por el ensayo SeptiFast de Roche Diagnostics (Lehmann et al, 2007, Med. Microbiol. Immunol. 197: 313-24), las sensibilidades analíticas fueron al menos equivalentes. Es importante destacar que el ensayo SeptiFast requiere un protocolo de preparación de la muestra sanguínea más complejo y mucho más lento que el método de la presente invención.

TABLA 3 - ESPECIES BACTERIANAS Y FÚNGICAS RECUPERADAS A BAJAS CONCENTRACIONES CELULARES A PARTIR DE ESPECÍMENES DE SANGRE CONTAMINADOS TRATADOS USANDO LOS MÉTODOS DE ESTA INVENCION

	Sensibilidad analítica* en CFU/mL de sangre (menor carga celular evaluada)	
	Método de una etapa	Método de dos etapas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3 (3)	1 (1)
<i>Bacteroides fragilis</i>	30 (15)	15 (15)
<i>Burkholderia cepacia</i>	NT	5 (5)
<i>Citrobacter freundii</i>	2,5 (1)	1 (1)
<i>Citrobacter koseri</i>	7 (7)	7 (7)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2 (2)	10 (10)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3 (3)	12 (12)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 (2)	14 (14)
<i>Enterococcus faecium</i>	4 (4)	7 (7)

ES 2 531 455 T3

Especies bacterianas	Sensibilidad analítica* en CFU/mL de sangre (menor carga celular evaluada)	
	Método de una etapa	Método de dos etapas
<i>Escherichia coli</i>	15 (15)	6 (6)
<i>Haemophilus influenzae</i>	9 (9)	5 (5)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3 (3)	19 (19)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 (3)	3 (3)
<i>Proteus mirabilis</i>	11 (11)	2 (2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17 (1)	6 (6)
<i>Serratia marcescens</i>	10 (10)	1 (1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 (8)	15 (8)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9 (5)	19 (5)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1 (1)	1 (1)
<i>Staphylococcus hominis</i>	4 (4)	4 (4)
<i>Staphylococcus warneri</i>	14 (14)	3 (3)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	7 (7)	7 (7)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	19 (19)	12 (12)
<i>Streptococcus anginosus</i>	16 (16)	7 (7)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	14 (5)	14 (5)
<i>Streptococcus mutans</i>	20 (10)	10 (10)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6 (6)	6 (6)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	47 (25)	25 (25)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	9 (9)	6 (6)
<i>Candida albicans</i>	NT	8 (8)
<i>Candida glabrata</i>	NT	14 (14)
<i>Candida krusei</i>	NT	17 (17)
<i>Candida parapsilosis</i>	NT	15 (15)
<i>Candida tropicalis</i>	NT	10 (10)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NT	10 (10)

*La detección se llevó a cabo mediante amplificación de PCR en un termociclador Rotor-Gene™ y los amplicones fueron caracterizados mediante análisis de curva de fusión SYBR Green. NT: no evaluado.

EJEMPLO 5 - CONCENTRACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE CÉLULAS MICROBIANAS VIABLES PROCEDENTES DE SANGRE CON UNA BAJA CARGA DE CÉLULAS MICROBIANAS

- 5 Se examinó la viabilidad de las células microbianas tras su recuperación a partir de especímenes de sangre contaminados con una baja carga de células microbianas usando el método de esta invención. Se inocularon 5 mL de muestras de sangre entera con aproximadamente 2, 10 ó 20 CFU de *Streptococcus pneumoniae* por mL en tres réplicas. La sangre contaminada fue tratada con saponina usando el método de tratamiento sencillo descrito anteriormente y como se indica a continuación. Se añadieron 20 mL de HFATS 100 mg/mL en TE 1X a las muestras
- 10 de sangre contaminadas y se mezcló durante 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. Los residuos de sangre y de células microbianas se obtuvieron en forma de partícula mediante centrifugación a 10.000 g durante 5 minutos, y el sobrenadante fue descartado. La partícula se lavó en 1,7 mL de PBS 1X rompiendo mecánicamente la partícula mediante pipeteo arriba y abajo y se mezcló durante 10 segundos usando un vórtex a velocidad máxima. La suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Esta
- 15 etapa de lavado se repitió una vez. Se añadieron 60 µL de PBS 1X (disolución de lavado y de recolección) a la partícula lavada y se agitó vigorosamente durante 15 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad.

La partícula se retiró mecánicamente usando una punta de micropipeta y se transfirió a 3 mL de caldo de infusión de hogar cerebral enriquecido (eBHI, del inglés "enriched brain hearth infusion broth") o a un nuevo tubo que contenía

25 µL de PBS 1X. El PBS 1X que contenía la partícula fue llevado posteriormente a placa sobre medio de agar sanguíneo. La suspensión acuosa total recolectada que comprendía las células microbianas recolectadas se transfirió a 3 mL de eBHI o a placa sobre medio agar sanguíneo.

5 Las placas y los caldos fueron incubados a 35°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante una noche para la determinación del recuento de CFU y la evaluación de crecimiento. Las células bacterianas viables fueron recuperadas de la suspensión acuosa incluso cuando había tan pocas como 10 CFU de *S. pneumoniae* presentes en la muestra inicial de sangre de 5 mL (es decir, 2 CFU/mL). También se pudo recuperar las células bacterianas viables a partir de la partícula. Además, dichas células bacterianas recuperadas son capaces de crecer tanto sobre
10 medio de agar sanguíneo como en eBHI.

También se recuperaron células microbianas viables de *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* cuando la sangre había sido contaminada con una baja carga celular de estos cinco microorganismos.

15 Estos resultados muestran que el método de la presente invención permite la recuperación de un alto porcentaje de células viables incluso cuando se usa una baja carga de microorganismos para contaminar una muestra sanguínea. Estos resultados, obtenidos con células viables procedentes de una suspensión acuosa recolectada o de la partícula, son reproducibles dentro de un rango de 0,2 a 22 CFU por mL de sangre.

20 **EJEMPLO 6 - CONCENTRACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE CÉLULAS MICROBIANAS VIABLES PROCEDENTES DE SANGRE CON UNA ALTA CARGA DE CÉLULAS MICROBIANAS**

25 Se examinó la viabilidad de las células microbianas tras su recuperación a partir de especímenes de sangre contaminados con una alta carga de células microbianas usando el método de esta invención. Se inocularon tres réplicas de 5 mL de muestras de sangre entera con 10.700 CFU de *Escherichia coli* por mL. La sangre contaminada fue tratada con el método de una etapa descrito anteriormente y como se indica a continuación. Se añadieron 20 mL de HFATS 100 mg/mL en TE 1X a las muestras de sangre contaminadas y se mezcló durante 10 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. Los residuos de sangre y de células microbianas se obtuvieron en forma de
30 partícula mediante centrifugación a 10.000 g durante 5 minutos, y el sobrenadante fue descartado.

35 La partícula se lavó en 1,7 mL de PBS 1X rompiendo mecánicamente la partícula mediante pipeteo arriba y abajo y se mezcló durante 10 segundos usando un vórtex a velocidad máxima. Se transfirieron 100 µL de la suspensión a un nuevo tubo para proceder a nuevas diluciones en serie en PBS 1X. Tres réplicas de la dilución 10⁻¹ fueron llevadas a placa sobre medio agar sanguíneo. Se transfirieron 5 µL de la suspensión no diluida en 3 mL de eBHI. La suspensión remanente se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Las etapas de lavado, muestreo y procesamiento se repitieron una vez.

40 Se añadieron 60 µL de TE 1X (disolución de lavado y de recolección) a la partícula lavada y se mezcló durante 15 segundos usando un vórtex fijado a máxima velocidad. La partícula se retiró mecánicamente usando una punta de micropipeta y se transfirió a 3 mL de eBHI por triplicado o a un nuevo tubo que contenía 25 µL de PBS 1X por triplicado. El PBS 1X que contenía la partícula fue llevado posteriormente a placa sobre medio de agar sanguíneo. Se transfirieron 30 µL de la fase acuosa total que comprende las células microbianas recolectadas a un nuevo tubo para proceder a nuevas diluciones en serie en PBS 1X. Tres réplicas de cada dilución en serie fueron llevadas a
45 placa sobre medio agar sanguíneo. Se transfirieron 5 µL de la suspensión no diluida en 3 mL de eBHI.

50 Las placas y los caldos fueron incubados a 35°C para las determinaciones de recuento de CFU. Los resultados mostraron que tras la primera y la segunda etapas de lavado, las células microbianas fueron recuperadas con un promedio de 106% ± 27% y 117% ± 19%, respectivamente. Estos porcentajes representan la proporción entre el número de células viables de *E. coli* en cada etapa frente al número de células de *E. coli* viables inoculadas inicialmente a la muestra de sangre. Tras la etapa final, se recuperaron el 85% ± 18% de las células viables de *E. coli*. Estos resultados muestran que se recuperó una elevada proporción de células bacterianas viables de cada suspensión de lavado, así como de la suspensión final de lavado/recolección. Además, dichas células bacterianas recuperadas son capaces de crecer en eBHI. Estos resultados muestran que los métodos de la presente invención
55 permiten la recuperación de un elevado porcentaje de las células viables en cualquier etapa durante el procesamiento de la muestra.

Aunque la presente invención ha sido descrita a través de ejemplos de realizaciones, los especialistas en la técnica deberían entender que se pueden realizar e incluir los anteriores y otros diversos cambios, omisiones y adiciones.

60 **Referencias**

Publicación EPO nº 0.745.849

65 Publicación EPO nº 1.422.509

- Patente de EE.UU. nº 3.883.425
- Patente de EE.UU. nº 4.164.449
- 5 Patente de EE.UU. nº 5.645.992
- WO 03087402
- Al-Soud et al., 2000, *J. Clin. Microbiol.*, 39: 485-493
- 10 Barr, et al., 1998, *Ad Drug Deliv Rev*, 32: 247-271
- Bernhardt et al., 1991, *J. Clin. Microbiol.*, 29: 422-425
- 15 Bougnoux et al., 1999, *J. Clin. Microbiol.*, 37: 925-930
- Carter-Wallace, Inc., Cranbury, N.J. 08512-0181
- Cockerill et al., 1996, *J. Clin. Microbiol.*, 34: 20-24
- 20 Daar et al., 2002, *Nat. Genet.*, 32: 229-232
- Francis et al., 2002, *British J of Nutrition*, 88: 587-605
- 25 Grossi et al., 2006, *Surg. Infect. (Larchmt)* 7: S87-S91
- Güçlü-Üstündag, Ö., et al., 2007, *Crit Rev Food Sci Nut*: 231-258
- Henry et al., 1983, *J. Clin. Microbiol.*, 17: 864-869
- 30 Hoorfar et al., 2004, *J. Appl. Microbiol.*, 96: 221-222
- Hoorfar et al., 2004, *Lett. Appl. Microbiol.*, 38: 79-80
- 35 Jonsson et al., 1993, *APMIS*, 101: 595-601
- Jordan et al, 2005, *J. Mol. Diagn.*, 7: 575-581
- Kiehn et al., 1983, *J. Clin. Microbiol.*, 18: 300-304
- 40 Leconte et al.. 1997, *Phytochem.*, 44: 575-579
- Lehmann et al, 2007, *Med. Microbiol. Immunol.* 197: 313-24
- 45 Link et al., 2007, *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 680-688;
- Loeffler et al., 2002, *J. Clin. Microbiol.*, 40: 2240-2243
- McLaughlin et al.. 1983, *J. Clin. Microbiol.*, 18: 1027-1031
- 50 Melzig, et al., 2001, *Planta Med.*, 67: 43-48
- Metzger, S. et al, reunión general de la ASM de 2008, Resumen C-005
- 55 Metzger, S. et al, reunión general de la ASM de 2008, Resumen C-145
- Milgate et al., 1995, *Nutrition Research*, 15, nº 8; 1223-1249
- Mitra et al., 1997, *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1587-1595
- 60 Murray et al., 1991,,*J. Clin. Microbiol.*, 29: 901-905
- Okubo, K. et al, *Oxygen-Saponins used in food and agriculture* Plenum Press, NY, 1996
- 65 San Martin et al., 2000, *J. Sci. Food Agric.*, 80: 2063-2068

Takechi et al., 2003, *Phytother. Res.*, 17: 83-85

Taylor, 1994, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 13: 249-252

5 Weibel et al., 2007, *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 209-218

White et al., 2006, *Clin. Infect. Dis.*, 42: 479-486

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Université Laval
- <120> Concentración y enriquecimiento de células microbianas y ácidos nucleicos microbianos a partir de fluidos corporales
- 15 <130> 09969-075
- <150> US 60/935.244
- <151> 02-08-2007
- 20 <150> US 61/008.292
- <151> 20-12-2007
- <160> 32
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 21
- 30 <212> ADN
- <213> *Enterococcus faecalis*
- <400> 1
- 35 actgtccac gttsgatrtc t 21
- <210> 2
- <211> 23
- <212> ADN
- 40 <213> *Enterococcus faecalis*
- <400> 2
- 45 aattaatggc tgcwgttgay gaa 23
- <210> 3
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> *Enterococcus faecalis*
- 50 <400> 3
- atccaactc cagaacgtga ya 22
- 55 <210> 4
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
- 60 <400> 4
- tggaagcga aaatcctg 18
- <210> 5
- 65 <211> 19
- <212> ADN

<213> *Escherichia coli*
 <400> 5
 5 cagtacaggt agacttctg 19
 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> *Escherichia coli*
 <400> 6
 aactggctgg cttcctgg 18
 15 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Artificial
 <220>
 25 <221> características_misceláneas
 <222> (12)..(12)
 <223> n corresponde a inosina
 <400> 7
 30 actggygttg anatgtccg yaa 23
 <210> 8
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 40 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (9)..(9)
 <223> n corresponde a inosina
 45 <400> 8
 acgtcagtn g tacggaarta gaa 23
 50 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Enterococcus faecalis*
 55 <400> 9
 acaggtgttg aaatgtccg taa 23
 60 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Enterococcus faecalis*
 <400> 10
 65 acgtctgttg tacggaagta gaa 23

<210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> *Clostridium perfringens*

 <400> 11

 caggaatcga aatgttcaga aag 23
 10
 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Clostridium perfringens*
 15
 <400> 12

 acgtctgttg ttctgaagta gaa 23
 20
 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium jeikeium*
 25
 <400> 13

 acctccatcg agatgttcaa caa 23
 30
 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium jeikeium*
 35
 <400> 14

 ggtggtgctg aagtagaa 18
 40
 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Capnocytophaga canimorsus*

 <400> 15
 45
 acaggagtgtg agatgttccg taa 23

 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> *Capnocytophaga canimorsus*

 <400> 16

 acgtcagttg tacgaacata gaa 23
 55
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Artificial

 <220>
 65 <221> características_miscláneas
 <222> (7)..(7)

<223> n es inosina
 <400> 17
 5 ggtwgtngct gcgactgacg g 21
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Artificial
 <400> 18
 15 tcaatcgcac gctctggttc 20
 <210> 19
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp.
 <400> 19
 25 aacgtggca agtwttagc 19
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> *Staphylococcus* sp.
 <400> 20
 35 gtacggaart agaattgwg 20
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus* sp.
 40 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (8)..(8)
 <223> n es inosina
 45 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (11)..(11)
 <223> n es inosina
 50 <400> 21
 gtggratngc ngcctttatc g 21
 55 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus* sp.
 60 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (3)..(3)
 <223> n es inosina
 65 <400> 22

atngcctgrc tcatcatacg 20

<210> 23
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> *Candida* sp.

<220>
 <221> características_misceláneas
 10 <222> (19)..(19)
 <223> n es inosina

<400> 23

15 caagatggay tcygtyaant ggga 24

<210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> *Candida* sp.

<400> 24

25 catcttgcaa tggcaatctc aatg 24

<210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> *Candida krusei*

<400> 25

catcttgtaa tggtaatctt aatg 24

35 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus* sp.

40 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (11)..(11)
 <223> n es inosina

45 <400> 26

gtccagacy nccaagtatg ag 22

<210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> *Aspergillus* sp.

<400> 27

55 atttcgtgt aacgatcctc gga 23

<210> 28
 <211> 24
 60 <212> ADN
 <213> *Aspergillus flavus*

<400> 28

65 gatttcgttg taacgatcct gaga 24

ES 2 531 455 T3

<210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus terreus*
 5
 <400> 29
 attcgttgt aacggtcctc aga 23
 10
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Artificial
 <220>
 <221> características_miscláneas
 20
 <222> (11)..(11)
 <223> n es inosina
 <400> 30
 25
 tgatgccgrt ngaagacgtg 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 30
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 35
 <400> 31
 agyttgcgga acattcaac 20
 40
 <210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45
 <223> Artificial
 <400> 32
 50
 gtgggaagcg aaaatcctg 19

- a. poner en contacto una muestra de sangre con una formulación de saponina hasta una concentración final de saponina en el intervalo de 75 mg/mL a 100 mg/mL, donde dicha formulación de saponina es una disolución de saponina tratada en autoclave, filtrada y calentada (HFATS);
- 5 b. aislar microorganismos que tengan ácidos nucleicos usando al menos una etapa de centrifugación y/o al menos una etapa de filtración; y
- c. determinar la presencia de microorganismos aislados que tengan ácidos nucleicos.
- 10 **18.** El método de la reivindicación 17, en el que la determinación de la presencia de microorganismos aislados comprende amplificar ácidos nucleicos procedentes de dicho(s) microorganismo(s).
- 19.** El método de la reivindicación 17 ó de la reivindicación 18, en el que dicha muestra de sangre es sangre humana.
- 15 **20.** Un método para diagnosticar una infección del torrente sanguíneo en un sujeto, que comprende detectar microorganismos según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que la presencia de microorganismos es indicativa de una infección asociada a dichos microorganismos.
- 20 **21.** Un método para obtener ácidos nucleicos de microorganismos presentes en una muestra de sangre, comprendiendo dicho método:
- a. poner en contacto la muestra de sangre con una formulación de saponinas, donde la saponina es una disolución de saponina tratada en autoclave y filtrada (FATS) o una disolución de saponina tratada en autoclave, filtrada y calentada (HFATS) presente en una concentración final de 40 mg/mL a 100 mg/mL;
- 25 b. obtener microorganismos aislados que comprenden ácidos nucleicos; y
- c. lisar los microorganismos aislados para obtener a partir de ellos ácidos nucleicos.
- 30 **22.** El método de la reivindicación 21, en el que la obtención de microorganismos aislados comprende al menos una etapa de centrifugación y/o al menos una etapa de filtración.
- 23.** El método de la reivindicación 21 ó 22, que además comprende amplificar los ácidos nucleicos procedentes de dichos microorganismos con el propósito de identificación y/o diagnóstico.
- 35

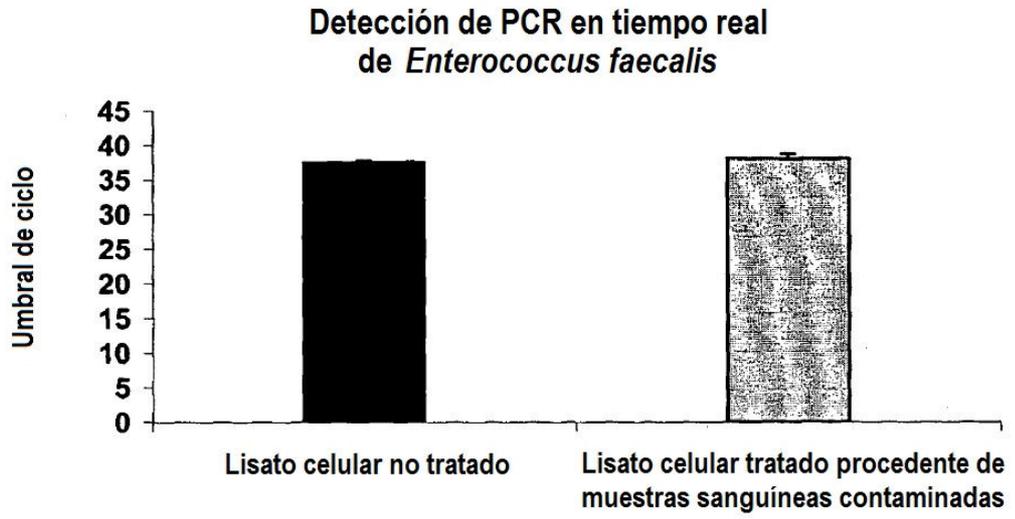


FIGURA 1

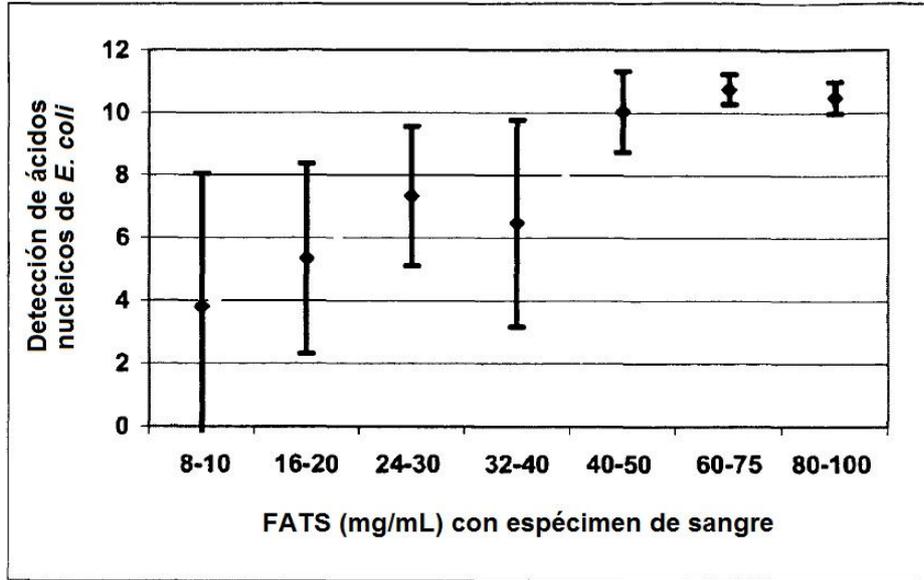


FIGURA 2