

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 497**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

H01J 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2009 E 09756867 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2350667**

54 Título: **Métodos para la identificación de microorganismos usando espectrometría de masas**

30 Prioridad:

31.10.2008 US 110187 P

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

22.06.2015

73 Titular/es:

**BIOMERIEUX, INC (100.0%)
100 Rodolphe Street
Durham, NC 27712, US**

72 Inventor/es:

**HYMAN, JONES;
CLAY, BRADFORD;
WALSH, JOHN y
THORPE, THURMAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 538 497 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

Métodos para la identificación de microorganismos usando espectrometría de masas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para identificar microorganismos en una muestra de sangre. En particular, la presente invención es un método dirigido para la rápida identificación de un microorganismo usando espectrometría de masas.

Antecedentes de la invención

10 La detección de microorganismos patógenos en fluidos biológicos se debería llevar a cabo en el menor tiempo posible, en particular en el caso de una septicemia, para la cual la mortalidad sigue siendo elevada a pesar de la gran variedad de antibióticos de que disponen los médicos. La presencia de agentes biológicamente activos, tal como un microorganismo, en un fluido corporal de un paciente, especialmente en la sangre, se determina generalmente usando frascos para cultivo de sangre. Las infecciones en la corriente sanguínea se asocian con una morbilidad y una mortalidad elevadas; sin embargo, puede llevar varios días la realización de los métodos de diagnóstico actuales, de cultivo seguidos de una prueba de identificación bioquímica y de susceptibilidad a 15 antibióticos. Típicamente, se inicia una terapia empírica basándose en síntomas clínicos, y los resultados de los ensayos sólo afectan a las decisiones clínicas cuando falla la terapia inicial. La capacidad para caracterizar infecciones en la corriente sanguínea en las primeras pocas horas, preferiblemente en una hora después de un resultado positivo en el cultivo de sangre, impulsaría significativamente la relevancia clínica de la información diagnóstica proporcionada. Se han propuesto métodos de multiplicación molecular para satisfacer esta necesidad, pero sigue habiendo importantes desafíos a este planteamiento. El propio caldo de cultivo sanguíneo positivo representa una población naturalmente multiplicada de microorganismos con potencial para uso en una diversidad de rápidas pruebas de identificación (ID). 20

25 Las pruebas de ID fenotípicas automatizadas tradicionales, tales como los sistemas Vitek[®], Phoenix[™] y Microscan[®], o las pruebas fenotípicas manuales tales como API, para que proporcionen unos resultados fiables, requieren que los microorganismos estén en una fase de crecimiento apropiada y exentos de medios y productos sanguíneos que interfieran. En estos sistemas se emplean colonias desarrolladas a partir del caldo positivo durante 18-24 horas en medios para cultivo en placa. Sin embargo, en un esfuerzo para obtener resultados más rápidamente, algunos laboratorios han comunicado la utilización de estos sistemas con microorganismos aislados de frascos de cultivo sanguíneo positivo. Estas pruebas "directamente desde el frasco" no son apropiadas para todos los 30 microorganismos (por ejemplo, para cocos Gram positivos) y no están validadas por los fabricantes de las pruebas, y generalmente lleva 3-8 horas la obtención de resultados. Se necesitan urgentemente pruebas más rápidas y de mayor especificidad con objeto de proporcionar al médico unos resultados clínicamente relevantes en las primeras pocas horas, preferiblemente en una hora después de un resultado de cultivo positivo.

35 Los métodos espectrométricos de masas presentan el potencial de permitir la identificación de microorganismos muy rápidamente, pero se pueden encontrar con la interferencia de los muchos compuestos presentes en medios líquidos para cultivo microbiológico y en muestras clínicas tales como sangre, o en combinaciones de los mismos. Los métodos más comúnmente empleados para recuperar directamente microorganismos de un caldo de cultivo sanguíneo positivo son la centrifugación diferencial en dos operaciones y la centrifugación en un tubo para separación de suero.

40 Otros métodos que se han descrito para la separación e identificación de microorganismos incluyen:

45 En la Patente de EE.UU. nº 6.177.266 se describe un método para la clasificación quimiotaxonómica de bacterias con biomarcadores específicos de género, especie y cepa generados mediante el análisis de extractos proteicos celulares o células completas por espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS; del inglés, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry).

50 En la Patente de EE.UU. nº 7.070.739 y el Documento WO 02/21108 se presenta un método para extraer, separar y purificar microbios, incluyendo virus, mediante la ultracentrifugación bidimensional directa de fluidos corporales o tejido homogeneizado. En una primera operación de centrifugación, se separan todas las partículas que tienen una velocidad de sedimentación superior a la de los microbios que se van a identificar. En la segunda operación de ultracentrifugación, se utiliza la formación de bandas isopícnicas en líquidos preparados para formar un gradiente de densidades de amplio alcance, usando tubos de centrífuga dentados especiales. De acuerdo con la patente, se puede utilizar la técnica de separación para detectar partículas dispuestas en bandas mediante dispersión lumínica o fluorescencia usando colorantes específicos de ácidos nucleicos, y para recuperar las partículas dispuestas en 55 bandas en volúmenes muy pequeños para la caracterización de subunidades proteicas víricas y partículas víricas intactas mediante espectrometría de masas, y para la determinación tanto de la masa del ácido nucleico como de las masas de los fragmentos producidos por enzimas de restricción mediante citometría de flujo por fluorescencia.

En la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2007/0175278 se describe la utilización de un medio de

5 cultivo líquido para cultivar una muestra de interés, que incluye, por ejemplo, sangre, orina, heces, catéteres intravenosos, etcétera, líneas de producción industriales, sistemas de agua, un producto alimenticio, un producto cosmético, un producto farmacéutico y una muestra forense. Posteriormente, los microorganismos pueden ser recogidos del medio líquido por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por centrifugación. Los microorganismos concentrados pueden ser luego transferidos a un material de soporte, opcionalmente después de un secado, para obtener un espectro de vibración. En la solicitud de patente se discuten diversos métodos para identificar y clasificar microorganismos, incluyendo la espectroscopía de vibración, tal como la espectroscopía Raman.

10 Sin embargo, estos métodos presentan varios inconvenientes cuando se intenta separar y caracterizar microorganismos de muestras complejas tales como medios de cultivo que contienen sangre. Las preparaciones microbianas resultantes contienen a menudo glóbulos rojos, plaquetas, partículas lipídicas, enzimas plasmáticas y fragmentos celulares contaminantes, que pueden causar malos resultados. Estos métodos son también muy laboriosos e inseguros para el usuario a causa de operaciones que pueden dar lugar a una exposición a agentes patógenos potencialmente peligrosos en forma de aerosol. Se necesitan métodos sencillos, seguros y fiables para aislar microorganismos de caldos para cultivo de sangre y otras muestras complejas, que estén exentos de estos materiales que interfieren y sean compatibles con tecnologías de identificación rápida.

15 En la Patente de EE.UU. n° 4.212.948 se describe un método para analizar una muestra de sangre, que implica depositar una muestra de sangre lisada sobre un agente amortiguador líquido, atóxico, hidrófobo, inmisible con agua y de alta densidad.

20 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para identificar microorganismos en una muestra de sangre. El método permite la identificación de microorganismos más rápidamente que las técnicas previas, lo que da lugar a diagnósticos más rápidos (por ejemplo, en un sujeto que tiene, o del que se sospecha que tiene, septicemia), y la identificación de materiales contaminados (por ejemplo, productos alimenticios y productos farmacéuticos). Las operaciones implicadas en el método de la invención, de obtención de una muestra de sangre para la identificación de microorganismos, pueden ser llevadas a cabo en un periodo de tiempo muy corto para producir una información procesable clínicamente relevante, por ejemplo, en menos de aproximadamente 120 minutos.

La presente invención se dirige a un método para identificar microorganismos de una muestra de sangre, que comprende:

30 (a) obtener una muestra de sangre de la que se sabe que contiene o puede contener microorganismos;

(b) lisar y solubilizar selectivamente células no microorganismo en dicha muestra de sangre con una disolución de lisis para producir una muestra lisada, disolución de lisis que tiene un pH de 8 a 13;

35 (c) poner una capa de dicha muestra lisada sobre un lecho amortiguador de densidad que tiene una densidad homogénea de 1,025 a 1,120 g/ml en un recipiente y centrifugar el recipiente para separar dichos microorganismos de otros componentes de dicha muestra lisada, microorganismos que atraviesan dicho lecho amortiguador de densidad para formar un sedimento de dichos microorganismos en el fondo de dicho recipiente;

(d) examinar dicho sedimento de dichos microorganismos por espectrometría de masas para adquirir un espectro de masas de dichos microorganismos: y

40 (e) identificar dichos microorganismos en dicho sedimento de muestra aislado por comparación del espectro de masas medido con espectros de masas de referencia y/o con las masas conocidas o previstas de componentes celulares de microorganismos conocidos, en donde dichos microorganismos son identificados a nivel de familia, nivel de género, nivel de especie y/o nivel de cepa.

La presente invención se define además en las reivindicaciones.

45 La presente invención se explica con mayor detalle en las figuras de esta memoria y en la descripción expuesta más adelante.

Breve descripción de las figuras

En la Figura 1 se muestran los espectros de masas de diversos microorganismos procesados y recuperados de un cultivo de sangre.

50 En la Figura 2 se muestran los espectros de masas de cinco productos de aislamiento de *S. aureus* procesados y recuperados de un caldo para cultivo de sangre.

En la Figura 3 se muestra una comparación de los espectros de masas de bacterias *E. coli* directamente de placas de agar y de bacterias *E. coli* procesadas a partir de un caldo para cultivo de sangre, de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta memoria tienen los mismos significados que los comúnmente entendidos por quien tiene una experiencia normal en la técnica a la cual pertenece esta invención.

5 Definiciones

Como se emplea en esta memoria, "un", "una", "el" o "la" puede significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una sola célula o una multiplicidad de células.

10 Como también se emplea en esta memoria, "y/o" se refiere a, y abarca, cualquier combinación y todas las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en el modo disyuntivo ("o").

Además, con el término "aproximadamente", como se emplea en esta memoria cuando se hace referencia a un valor mensurable tal como una cantidad de un compuesto o agente de esta invención, una dosis, un tiempo, una temperatura y similares, se quiere abarcar variaciones del $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$ o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.

15 Como se emplea en esta memoria, con el término "microorganismo" se pretende abarcar organismos que son generalmente unicelulares, que pueden ser multiplicados y manipulados en el laboratorio, incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias Gram positivas o Gram negativas, levaduras, mohos, parásitos y microorganismos de la clase *Mollicutes*. Los ejemplos no restrictivos de bacterias Gram negativas de esta invención incluyen bacterias de los géneros siguientes: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*,
 20 *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Ralstonia*, *Achromobacter*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Brucella*, *Pasteurella*, *Providencia* y *Legionella*. Los ejemplos no restrictivos de bacterias Gram positivas de esta invención incluyen bacterias de los géneros siguientes: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Peptostreptococcus*,
 25 *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Gardnerella*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacteria* y *Corynebacteria*. Los ejemplos no restrictivos de levaduras y mohos de esta invención incluyen aquellos de los géneros siguientes: *Candida*, *Cryptococcus*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*. Los ejemplos no restrictivos de parásitos de esta invención incluyen aquellos de los géneros siguientes: *Trypanosoma*, *Babesia*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Wuchereria*, *Brugia*,
 30 *Onchocerca* y *Naegleria*. Los ejemplos no restrictivos de microorganismos de la clase *Mollicutes* de esta invención incluyen aquellos de los géneros siguientes: *Mycoplasma* y *Ureaplasma*.

Como se describe en esta memoria con más detalle, los microorganismos de una muestra o un medio de crecimiento pueden ser separados y examinados para caracterizar y/o identificar el microorganismo presente en la muestra. Como se emplea en esta memoria, con el término "separar" se pretende abarcar cualquier muestra de
 35 microorganismos que ha sido retirada, concentrada o, en cualquier caso, apartada de su estado original, o de un medio de crecimiento o cultivo. Por ejemplo, los microorganismos pueden ser separados (por ejemplo, como una muestra separada) de los no microorganismos o los componentes de no microorganismo que, en caso contrario, pueden interferir en la caracterización y/o identificación. El término puede incluir una capa de microorganismos intercalada entre otras dos capas, por ejemplo, microorganismos recogidos en la parte superior de un lecho amortiguador de alta densidad después de una centrifugación, o una capa de microorganismos recogida sobre una superficie sólida (por ejemplo, una membrana de un filtro). El término también puede incluir una colección de
 40 microorganismos que ha atravesado parcialmente una capa (por ejemplo, un lecho amortiguador de densidad). De este modo, una muestra de microorganismos separada puede incluir cualquier colección o capa de microorganismos y/o componentes de los mismos que está más concentrada que, o, en cualquier caso, está apartada de, la muestra original, y puede variar desde un agregado denso y muy compacto de microorganismos hasta una capa difusa de microorganismos. Los componentes de microorganismo que pueden estar comprendidos en una forma o muestra separada incluyen, sin limitación, pili, flagelos, fimbrias y cápsulas en cualquier combinación. Los componentes de no microorganismo que son separados de los microorganismos pueden incluir células no microorganismo (por ejemplo, células sanguíneas y/u otras células tisulares) y/o cualesquier componentes de las mismas.

50 Como se describe en esta memoria con más detalle, los microorganismos de una muestra o un medio de crecimiento pueden ser aislados y examinados para caracterizar y/o identificar el microorganismo presente en la muestra. Como se emplea en esta memoria, con el término "aislado" se pretende abarcar cualquier muestra de microorganismos que ha sido al menos parcialmente purificada de su estado original, o de un medio de crecimiento o cultivo, y cualesquier no microorganismos o componentes de no microorganismo contenidos en ella. Por ejemplo,
 55 los microorganismos pueden ser aislados (por ejemplo, como una muestra aislada) de los no microorganismos o los componentes de no microorganismo que, en caso contrario, pueden interferir en la caracterización y/o identificación. Los componentes de no microorganismo que son separados de los microorganismos pueden incluir células no microorganismo (por ejemplo, células sanguíneas y/u otras células tisulares) y/o cualesquier componentes de las mismas.

Como se describe en esta memoria con más detalle, los microorganismos de una muestra de sangre pueden ser hechos sedimentar y ser examinados para identificar el microorganismo presente en la muestra. Como se emplea en esta memoria, con el término "sedimento" se pretende abarcar cualquier muestra de microorganismos que ha sido comprimida o depositada en una masa de microorganismos. Por ejemplo, los microorganismos de una muestra pueden ser comprimidos o depositados en una masa en el fondo de un tubo por centrifugación o por otros métodos conocidos de la técnica. El término incluye una colección de microorganismos (y/o componentes de los mismos) en el fondo y/o las caras de un recipiente después de una centrifugación. Los componentes de microorganismo que pueden estar comprendidos en un sedimento incluyen, sin limitación, pili, flagelos, fimbrias y cápsulas en cualquier combinación. De acuerdo con esta invención, los microorganismos pueden ser separados como sedimento (por ejemplo, como un sedimento de microorganismos sustancialmente purificado) de los no microorganismos o los componentes de no microorganismo que, en caso contrario, pueden interferir en la caracterización y/o identificación. Los componentes de no microorganismo que son separados de los microorganismos pueden incluir células no microorganismo (por ejemplo, células sanguíneas y/u otras células tisulares) y/o cualesquier componentes de las mismas.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "lecho amortiguador de densidad" se refiere a una disolución que tiene una densidad homogénea por toda ella.

La presente invención proporciona un método para identificar microorganismos en una muestra de sangre. Además, el método puede ser particularmente útil para la separación, caracterización y/o identificación de microorganismos de muestras complejas tales como medios de cultivo que contienen sangre. El rápido método también permite la identificación de microorganismos más rápidamente que las técnicas previas, lo que da lugar a diagnósticos más rápidos (por ejemplo, en un sujeto que tiene, o del que se sospecha que tiene, septicemia), y la identificación de materiales contaminados (por ejemplo, productos alimenticios y productos farmacéuticos). Las operaciones implicadas en el método de la invención, de obtención de una muestra para la identificación de microorganismos, pueden ser llevadas a cabo en un periodo de tiempo muy corto para obtener una información procesable clínicamente relevante. El método de la invención puede ser llevado a cabo en menos de aproximadamente 120 minutos, por ejemplo, en menos de aproximadamente 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 minuto. La tremenda rapidez del método de la invención representa una mejora con respecto a los métodos previos. El método puede ser empleado para identificar cualquier microorganismo como el descrito en esta memoria. El microorganismo puede ser una bacteria, una levadura, un moho, un parásito o un microorganismo de la clase *Mollicutes*. Además, el método de la invención puede ser totalmente automatizado, reduciéndose por ello el riesgo de manejar materiales infecciosos y/o contaminar las muestras.

El sedimento de microorganismos formado durante la operación de separación o una porción del mismo se puede recuperar del recipiente de separación antes del examen de los microorganismos. Por ejemplo, después de la formación del sedimento, se pueden separar los fluidos del sedimento por aspiración y se puede resuspender el sedimento en un medio adecuado (por ejemplo, un medio en el que los microorganismos son viables). Los microorganismos resuspendidos pueden ser retirados del recipiente de separación. Los microorganismos pueden ser luego examinados en cuanto a caracterización y/o identificación, por ejemplo, en la suspensión o después de que han sido hechos sedimentar de nuevo. Los microorganismos resuspendidos pueden ser examinados en el recipiente de separación, por ejemplo, en la suspensión o después de que han sido hechos sedimentar de nuevo. Los microorganismos recuperados del sedimento pueden ser utilizados directamente para el examen ulterior (por ejemplo, espectrometría de masas) sin ser resuspendidos.

Muestras

Las muestras que se pueden analizar (es decir, una muestra de ensayo) mediante el método de la invención incluyen muestras de sangre tanto clínicas como no clínicas en las que hay, o se puede sospechar que hay, presencia y/o crecimiento de microorganismos, así como muestras de sangre que son rutinaria u ocasionalmente analizadas en cuanto a la presencia de microorganismos. La cantidad de muestra utilizada puede variar ampliamente a causa de la versatilidad y/o sensibilidad del método. La preparación de las muestras puede ser llevada a cabo mediante cualquier número de técnicas conocidas por los expertos en este campo técnico, aunque una de las ventajas de la presente invención es que se pueden analizar directamente tipos de muestra complejos, tal como la sangre, utilizando el sistema con poco o ningún pretratamiento considerable. En una realización, la muestra es tomada de un cultivo. En otra realización, la muestra es tomada de un cultivo microbiológico (por ejemplo, un cultivo de sangre). En otra realización, se sospecha o se sabe que la muestra contiene microorganismos.

Aunque la invención se refiere a muestras de sangre, se pueden analizar muestras clínicas incluyendo cualquier tipo de muestra típicamente analizada en laboratorios clínicos o de investigación, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, suero, plasma, fracciones sanguíneas, fluido articular, orina, semen, saliva, heces, fluido cerebroespinal, contenidos gástricos, secreciones vaginales, productos de homogeneización de tejidos, productos de aspiración de médula ósea, productos de homogeneización de huesos, esputos, materiales obtenidos por aspiración, torundas y productos de enjuague de torundas, otros fluidos corporales, y similares. Se puede cultivar la muestra clínica y se puede emplear una muestra del cultivo.

La presente invención resulta útil en investigación así como en aplicaciones veterinarias y médicas. Los sujetos

adecuados de los cuales se pueden obtener muestras clínicas son generalmente sujetos mamíferos, pero pueden ser cualquier animal. El término "mamífero", como se emplea en esta memoria, incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, caballos, gatos, perros, conejos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), etcétera. Los sujetos humanos incluyen neonatos, niños, jóvenes, adultos y sujetos geriátricos. Los sujetos de los cuales se pueden obtener muestras incluyen, sin limitación, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces.

Aunque la invención se refiere a muestras de sangre, se pueden analizar también muestras no clínicas incluyendo sustancias que abarcan, pero no se limitan a, productos alimenticios, bebidas, productos farmacéuticos, productos cosméticos, agua (por ejemplo, agua potable, agua no potable y agua de desecho), lastres de agua marina, aire, tierra, aguas residuales, material vegetal (por ejemplo, semillas, hojas, tallos, raíces, flores y frutos), productos sanguíneos (por ejemplo, plaquetas, suero, plasma, fracciones de glóbulos blancos, etc.), muestras de órganos o tejidos de donantes, muestras de guerra bacteriológica, y similares. El método es también particularmente muy adecuado para ensayos en tiempo real para determinar niveles de contaminación, control de procesos, control de calidad y similares en escenarios industriales. Se puede cultivar la muestra no clínica y se puede emplear una muestra del cultivo.

Con objeto de llevar el método de la invención a la práctica, se obtienen muestras de un sujeto (por ejemplo, un paciente) que tiene, o del que se sospecha que tiene, una infección microbiana. Opcionalmente, el sujeto tiene, o se sospecha que tiene, septicemia, por ejemplo, bacteriemia o fungemia. La muestra puede ser una muestra de sangre obtenida directamente del sujeto. La muestra puede proceder de un cultivo de sangre desarrollado a partir de una muestra de sangre del paciente, por ejemplo, un cultivo de sangre BacT/ALERT[®]. La muestra de cultivo de sangre puede ser de un cultivo de sangre positivo, por ejemplo, un cultivo de sangre que indica la presencia de un microorganismo. En ciertas realizaciones, la muestra se toma de un cultivo de sangre positivo poco tiempo después de que se vuelva positivo, por ejemplo, en aproximadamente 6 horas, por ejemplo, en aproximadamente 5, 4, 3 o 2 horas, o en aproximadamente 60 minutos, por ejemplo, aproximadamente 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 minuto. La muestra puede ser tomada de un cultivo en que los microorganismos están en crecimiento en fase logarítmica o de un cultivo en que los microorganismos están en una fase estacionaria.

La presente invención proporciona una elevada sensibilidad para la identificación de microorganismos. Esto permite la identificación sin tener que ir primero a través de las operaciones de aislar los microorganismos haciéndoles crecer sobre un medio sólido o semisólido y tomar muestras de las colonias que crecen. De este modo, la muestra no es de una colonia microbiana (por ejemplo, de bacterias, levaduras o mohos) desarrollada sobre una superficie sólida o semisólida.

El volumen de la muestra debería ser lo suficientemente grande para producir una muestra aislada de microorganismos o un sedimento de microorganismos que se pueda examinar una vez que se ha llevado a cabo la operación de separación/aislamiento del método de la invención. Los volúmenes apropiados dependerán de la fuente de la muestra y del previsto nivel de microorganismos en la muestra. Por ejemplo, un cultivo de sangre positivo contendrá un nivel mayor de microorganismos por unidad de volumen que una muestra de agua potable que va a ser analizada en cuanto a su contaminación, por lo que puede que sea necesario un volumen más pequeño de medio de cultivo de sangre que de muestra de agua potable. En general, el tamaño de la muestra puede ser inferior a aproximadamente 50 ml, por ejemplo, inferior a aproximadamente 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3 o 2 ml. En ciertas realizaciones, el tamaño de la muestra puede ser aproximadamente 1 ml, por ejemplo, aproximadamente 0,75, 0,5 o 0,25 ml. En ciertas realizaciones en que se lleva a cabo la separación a microescala, el tamaño de la muestra puede ser inferior a aproximadamente 200 µl, por ejemplo, inferior a aproximadamente 150, 100, 50, 25, 20, 15, 10 o 5 µl. En algunas realizaciones (por ejemplo, cuando se espera que la muestra comprenda un número pequeño de microorganismos), el tamaño de la muestra puede ser aproximadamente 100 ml o más, por ejemplo, aproximadamente 250, 500, 750 o 1000 ml o más.

Operación de lisis

De acuerdo con la invención, después de la obtención de una muestra, la siguiente operación en el método de la presente invención es lisar y solubilizar selectivamente las células indeseadas que pueden estar presentes en la muestra, por ejemplo, células sanguíneas y/o células tisulares. Las células pueden ser lisadas para permitir la separación de los microorganismos de otros componentes de la muestra. La separación de los microorganismos de otros componentes evita la interferencia durante la operación de examen. Las células que se van a lisar son células no microorganismo que están presentes en la muestra, y las células no microorganismo que pueden estar presentes en la muestra son lisadas. Sin embargo, la lisis selectiva de clases específicas de microorganismos puede ser deseable y, por lo tanto, se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede lisar selectivamente una clase de microorganismos indeseados; por ejemplo, se lisan las levaduras aunque no las bacterias o viceversa. Los microorganismos deseados pueden ser lisados con objeto de separar un componente subcelular concreto de los microorganismos, por ejemplo, membranas u orgánulos celulares. Se pueden lisar todas las células no microbianas o se puede lisar una porción de las células no microbianas, por ejemplo, células suficientes para evitar la interferencia en la operación de examen. La lisis de las células se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica por ser eficaz para lisar selectivamente células con o sin lisis de microorganismos, incluyendo, sin limitación, adición de una disolución de lisis, sonicación, choque

osmótico, tratamiento químico y/o una combinación de estos métodos.

Una disolución de lisis es una que es capaz de lisar células, por ejemplo, células no microorganismo (por ejemplo, al solubilizar membranas de células eucarióticas) y/o células microorganismo. En una realización, la disolución de lisis puede comprender uno o más detergentes, una o más enzimas, o una combinación de uno o más detergentes y una o más enzimas, y puede incluir además agentes adicionales. En una realización, el detergente puede ser un detergente lítico no desnaturizante, tal como Triton[®] X-100, Triton[®] X-100-R, Triton[®] X-114, NP-40, Genapol[®] C-100, Genapol[®] X-100, Igepal[®] CA 630, Arlasolve[™] 200, Brij[®] 96/97, CHAPS, octil-β-D-glucopiranosido, saponina y nonaetilenglicol-monododecil-éter (C12E9, polidocanol). Opcionalmente, se pueden incluir detergentes líticos desnaturizantes, tales como dodecilsulfato sódico, N-laurilsarcosina, desoxicolato sódico, sales biliares, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, SB3-10, SB3-12, amidosulfobetaina-14 y C7BzO. Opcionalmente, también se pueden incluir agentes solubilizantes, tales como Brij[®] 98, Brij[®] 58, Brij[®] 35, Tween[®] 80, Tween[®] 20, Pluronic[®] L64, Pluronic[®] P84, sulfobetainas no detergentes (NDSB 201), anfípolos (PMAL-C8) y metil-β-ciclodextrina. Típicamente, los detergentes no desnaturizantes y los agentes solubilizantes se usan en concentraciones por encima de su concentración micelar crítica (CMC; del inglés, critical micelle concentration), mientras que los detergentes desnaturizantes se pueden añadir en concentraciones por debajo de su CMC. Por ejemplo, los detergentes líticos no desnaturizantes se pueden utilizar en una concentración de aproximadamente 0,010% a aproximadamente 10%, por ejemplo, de aproximadamente 0,015% a aproximadamente 1,0%, por ejemplo, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5%, por ejemplo, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,30% (concentración final después de la dilución con la muestra). En otra realización, se pueden preferir los detergentes de polioxietileno. El detergente de polioxietileno puede comprender la estructura C₁₂₋₁₈/E₉₋₁₀, en donde C₁₂₋₁₈ representa una cadena carbonada con una longitud de 12 a 18 átomos de carbono y E₉₋₁₀ representa de 9 a 10 grupos de oxietileno con cabeza hidrófila. Por ejemplo, el detergente de polioxietileno puede ser seleccionado del grupo que consiste en Brij[®] 97, Brij[®] 96V, Genapol[®] C-100, Genapol[®] X-100, nonaetilenglicol-monododecil-éter (polidocanol), y una combinación de los mismos.

Las enzimas que se pueden utilizar en las disoluciones de lisis incluyen, sin limitación, enzimas que digieren ácidos nucleicos y otros materiales que obstruyen las membranas (por ejemplo, proteinasa XXIII, DNasa, neuraminidasa, polisacaridasa, Glucanex[®] y Pectinex[®]). Otros aditivos que se pueden emplear incluyen, sin limitación, agentes reductores tales como 2-mercaptoetanol (2-Me) y ditiotreitól (DTT) y agentes estabilizantes tales como magnesio, piruvato, y agentes humectantes. La disolución de lisis está tamponada en un pH en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 13, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 13. Los tampones de pH adecuados incluyen cualquier tampón capaz de mantener el pH en el intervalo deseado, por ejemplo, CAPS en concentración de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 1,0 M.

La muestra y la disolución de lisis pueden ser mezcladas y luego incubadas durante un tiempo suficiente para que se produzcan la lisis y la solubilización de las membranas celulares, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 segundos, o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 minutos o más, por ejemplo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 5 minutos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 minutos. El tiempo de incubación dependerá de la fuerza de la disolución de lisis, por ejemplo, de la concentración del detergente y/o las enzimas. En general, tampones de lisis más suaves requerirán más tiempo y una mayor dilución de la muestra para solubilizar totalmente las células no microbianas. La fuerza de la disolución de lisis puede ser seleccionada basándose en los microorganismos que se sabe o se sospecha que están en la muestra. Para los microorganismos que son más susceptibles a la lisis se puede utilizar una disolución de lisis suave. La lisis puede tener lugar a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C. Se puede cargar la disolución de lisis en una jeringa y se puede luego aspirar la muestra en la jeringa para que tengan lugar el mezclamiento y la incubación dentro de la jeringa.

Las condiciones de la lisis (por ejemplo, la disolución o el tiempo de incubación), así como las operaciones de separación y/o examen, pueden ser suficientes para matar algunos o todos los microorganismos de la muestra. El método de la presente invención es muy versátil y no requiere que todos los microorganismos estén vivos para que se produzcan el aislamiento y la identificación. En ciertas realizaciones, algunos o todos los microorganismos pueden estar muertos, produciéndose la muerte antes, durante y/o después de que se lleven a cabo las operaciones del método.

En la solicitud de patente de EE.UU. en trámite, nº de serie 12/589.929, presentada el 30 de octubre de 2009, titulada "Methods for Isolation and Identification of Microorganisms", se describen más detalles y una descripción de los tampones de lisis contemplados en la práctica de esta invención.

Operación de separación

La siguiente operación en el método de la presente invención (por ejemplo, la operación después de que la muestra ha sido lisada) es una operación de separación. La operación de separación puede ser llevada a cabo para separar los microorganismos de otros componentes de la muestra (por ejemplo, no microorganismos o componentes de los mismos) y para concentrar los microorganismos en un sedimento que pueda ser examinado con fines de

identificación. La separación no tiene que ser completa; es decir, no se requiere que tenga lugar un 100% de separación. Todo lo que se requiere es que la separación de los microorganismos de otros componentes de la muestra sea suficiente para permitir el examen de los microorganismos sin una sustancial interferencia de los otros componentes. Por ejemplo, la separación puede dar lugar a un sedimento de microorganismos que tenga una pureza de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% o más.

La separación se lleva a cabo mediante una operación de centrifugación en la que se coloca la muestra (por ejemplo, una muestra lisada) en la parte superior de un lecho amortiguador de densidad en un recipiente de separación y se centrifuga el recipiente bajo unas condiciones que permiten que los microorganismos sean aislados (por ejemplo, los microorganismos pueden formar un sedimento en el fondo y/o las caras del recipiente). De acuerdo con esta realización, otros componentes de la muestra (por ejemplo, no microorganismos o componentes de los mismos que pueden estar presentes en el medio de la muestra) permanecen en la parte superior del lecho amortiguador de densidad o dentro de la porción superior del lecho amortiguador de densidad. En general, para la operación de separación se puede emplear cualquier recipiente conocido. En una realización, el recipiente de separación es el dispositivo de separación descrito en la solicitud de patente de EE.UU. relacionada, nº de serie 12/589.969, presentada el 30 de octubre de 2009, titulada "Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms". Esta operación de separación permite aislar los microorganismos de materiales de la muestra, tales como el medio, fragmentos celulares y/u otros componentes que podrían interferir en el examen de los microorganismos (por ejemplo, por fluorescencia intrínseca). El lecho amortiguador de densidad puede también servir para separar microorganismos vivos de microorganismos muertos (que no atraviesan el lecho amortiguador de densidad). El lecho amortiguador de densidad podría no comprender un gradiente de densidades, antes o después de la centrifugación. En otras palabras, el recipiente de separación no se centrifuga durante un periodo de tiempo y/o con una aceleración suficientes para que el material que compone el lecho amortiguador de densidad forme un gradiente de densidades.

La densidad del lecho amortiguador se selecciona para que los microorganismos de la muestra atraviesen el lecho amortiguador mientras otros componentes de la muestra (por ejemplo, el caldo para cultivo de sangre y los fragmentos celulares) permanecen en la parte superior del lecho amortiguador o no atraviesan completamente el lecho amortiguador de densidad. El lecho amortiguador de densidad puede ser también seleccionado para separar los microorganismos vivos (que atraviesan el lecho amortiguador) de los microorganismos muertos (que no atraviesan el lecho amortiguador). Las densidades adecuadas dependerán del material empleado en el lecho amortiguador de densidad y de la muestra que va a ser sometida a separación. La densidad del lecho amortiguador está en cualquier intervalo entre aproximadamente 1,025 y aproximadamente 1,120 g/ml. La densidad del lecho amortiguador puede ser aproximadamente 1,025, 1,030, 1,035, 1,040, 1,045, 1,050, 1,055, 1,060, 1,065, 1,070, 1,075, 1,080, 1,085, 1,090, 1,095, 1,100, 1,105, 1,110, 1,115 o 1,120 g/ml.

El material para el lecho amortiguador de densidad puede ser cualquier material que tenga el apropiado intervalo de densidades para el método de esta invención, por ejemplo, sílice coloidal. La sílice coloidal puede estar no revestida [por ejemplo, Ludox® (W. R. Grace, Connecticut, EE.UU.)] o revestida, por ejemplo, con silano [por ejemplo, PureSperm® (Nidacon Int'l, Suecia) o Isolate® (Irvine Scientific, Santa Ana, California, EE.UU.)] o polivinilpirrolidona [por ejemplo, Percoll™ o Percoll™ Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.)]. Se selecciona la sílice coloidal que presenta la menor interferencia con el examen espectroscópico, por ejemplo, el material con la mínima fluorescencia intrínseca. La sílice coloidal puede ser diluida en cualquier medio adecuado para obtener la densidad apropiada, por ejemplo, en disoluciones salinas equilibradas, disolución salina fisiológica y/o sacarosa 0,25 M. Se pueden obtener densidades adecuadas con sílice coloidal en una concentración de aproximadamente 15% a aproximadamente 80% en volumen/volumen, por ejemplo, de aproximadamente 20% a aproximadamente 65% en volumen/volumen. Otro material adecuado para los lechos amortiguadores de densidad es un agente de contraste yodado, por ejemplo, iohexol (Omnipaque™, NycoPrep™ o Nycodenz®) o iodixanol (Visipaque™ u OptiPrep™). Para muestras de cultivos de sangre se pueden obtener densidades adecuadas con iohexol o iodixanol en una concentración de aproximadamente 10% a aproximadamente 25% en peso/volumen, por ejemplo, de aproximadamente 14% a aproximadamente 18% en peso/volumen. Para muestras de cultivos de sangre se puede emplear sacarosa como un lecho amortiguador de densidad en una concentración de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% en peso/volumen, por ejemplo, de aproximadamente 15% a aproximadamente 20% en peso/volumen. Otros materiales adecuados que se pueden usar para preparar el lecho amortiguador de densidad incluyen aceites de baja viscosidad y alta densidad, tales como aceite de inmersión para microscopio (por ejemplo, Type DF; Cargille Labs, New York, EE.UU.), aceite mineral (por ejemplo, Drakeol® 5, Draketex 50, Penetec®; Penreco Co., Pennsylvania, EE.UU.), aceite de silicona (polidimetilsiloxano), aceite de fluorosilicona, gel de silicona, metrizoato-Ficoll® (LymphoPrep™), por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 75% a aproximadamente 100% para muestras de cultivos de sangre, diatrizoato-dextrano (PolymorphoPrep™), por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 25% a aproximadamente 50% para muestras de cultivos de sangre, carboximetil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, poli(óxido de etileno) (alto peso molecular), Pluronic® F127, Pluronic® F68, mezclas de compuestos de Pluronic®, poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico) reticulado, polivinilpirrolidina reticulada, metacrilato de PEG-metil-éter, pectina, agarosa, xantano, gellan, Phytigel®, sorbitol, Ficoll® (por ejemplo, Ficoll® 400 en una concentración de aproximadamente 10% a aproximadamente 15% para muestras de cultivos de sangre), glicerol, dextrano (por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 10% a aproximadamente 15% para muestras de cultivos de sangre), glucógeno, cloruro de cesio (por ejemplo, en una

concentración de aproximadamente 15% a aproximadamente 25% para muestras de cultivos de sangre), fluidos perfluorocarbonados (por ejemplo, perfluoro-n-octano), fluidos hidrofluorocarbonados (por ejemplo, Vertrel XF), y similares, como se conocen bien en la técnica. En una realización, el lecho amortiguador de densidad se selecciona de entre uno o más de sílice coloidal, iodixanol, iohexol, cloruro de cesio, metrizoato-Ficol[®], diatrizoato-dextrano, sacarosa, Ficol[®] 400, y/o dextrano en cualquier combinación. El lecho amortiguador de densidad puede estar también compuesto de una combinación de materiales, por ejemplo, una combinación de sílice coloidal y aceite. Ciertas combinaciones de los compuestos anteriores pueden ser beneficiosas para la operación de separación de la presente invención.

El volumen/altura del lecho amortiguador de densidad debería ser suficiente para alcanzar la separación de los microorganismos de otros componentes de la muestra. El volumen dependerá del tamaño y la forma del recipiente de separación. En general se puede emplear un volumen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1 ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 0,5 ml. Si la separación se lleva a cabo a microescala, el volumen del lecho amortiguador de densidad puede ser de aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 100 μ l, por ejemplo, de aproximadamente 5 μ l a aproximadamente 50 μ l. El volumen de la muestra depositada o dispuesta como capa sobre la parte superior del lecho amortiguador de densidad debería bastar para proporcionar los microorganismos suficientes para producir un sedimento adecuado para el examen. En general, se puede utilizar cualquier volumen que quepa en el recipiente. Por ejemplo, se puede usar un volumen de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 1 ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 0,5 ml. Si la separación se lleva a cabo a microescala, el volumen de muestra puede ser de aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 100 μ l, por ejemplo, de aproximadamente 5 μ l a aproximadamente 50 μ l. El espacio disponible en el recipiente para la muestra dependerá del tamaño y la forma del recipiente. Se puede colocar una capa intermedia (líquida o sólida) en la parte superior del lecho amortiguador de densidad antes de que la muestra se deposite o se disponga en forma de capa sobre la parte superior con objeto de evitar todo mezclamiento del lecho amortiguador de densidad con la muestra. La capa intermedia puede ser glóbulos de polietileno o una pequeña burbuja de aire situados entre el lecho amortiguador de densidad y la muestra para evitar el mezclamiento. El lecho amortiguador de densidad se puede disponer en forma de capa sobre la parte superior de un material de alta densidad (por ejemplo, un fluido perfluorocarbonado) para que los microorganismos atraviesen el lecho amortiguador de densidad durante la separación y se recojan en la interfase entre el lecho amortiguador de densidad y el material de alta densidad.

El recipiente de separación puede ser centrifugado en un rotor oscilante para que los microorganismos formen directamente un sedimento en el fondo del recipiente. El recipiente se centrifuga con una aceleración suficiente y durante un tiempo suficiente para que los microorganismos se separen (por ejemplo, se forme un sedimento) de otros componentes de la muestra. La aceleración de la centrifugación puede ser de aproximadamente 1000 x g a aproximadamente 20.000 x g, por ejemplo, de aproximadamente 2500 x g a aproximadamente 15.000 x g, por ejemplo, de aproximadamente 7500 x g a aproximadamente 12.500 x g, etc. El tiempo de centrifugación puede ser de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos. La centrifugación puede ser llevada a cabo a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, por ejemplo, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C. En una realización, el recipiente de separación comprende un cierre, y el cierre se aplica al recipiente para formar un sello hermético antes de la centrifugación. La presencia de un cierre disminuye los riesgos de la manipulación de microorganismos que son o pueden ser infecciosos y/o peligrosos, así como el riesgo de contaminar la muestra. Una de las ventajas del método de la invención es la capacidad para llevar a cabo una cualquiera o más de las operaciones del método (por ejemplo, lisis, separación, examen y/o identificación) con los microorganismos en un recipiente sellado (por ejemplo, un recipiente herméticamente sellado). Al implicar el uso de sistemas automatizados, se evitan los riesgos para la salud y la seguridad asociados con la manipulación de microorganismos muy virulentos, tal como sucede con la recuperación de microorganismos de muestras para ensayo directo. El recipiente podría no ser centrifugado durante un tiempo y/o con una fuerza suficientes para que se formara un gradiente de densidades dentro del lecho amortiguador de densidad. La presente invención no implica la ultracentrifugación de muestras, por ejemplo, la centrifugación con fuerzas superiores a aproximadamente 100.000 x g. Además, la presente invención no implica sedimentación isopícnica (en equilibrio) ni formación de bandas isopínicas.

El recipiente de separación puede ser cualquier recipiente con un volumen suficiente para contener un lecho amortiguador de densidad y una muestra. Como se indicó en esta memoria, en la práctica de esta invención se puede emplear el dispositivo de separación descrito en la solicitud de patente de EE.UU. relacionada, n° de serie 12/589.969, presentada el 30 de octubre de 2009, titulada "Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms". El recipiente se encaja o se puede encajar en un rotor de centrífuga. El volumen del recipiente puede ser de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 25 ml, por ejemplo de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml, por ejemplo, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 8 ml. Si la separación se realiza a microescala, el volumen del recipiente puede ser de aproximadamente 2 μ l a aproximadamente 100 μ l, por ejemplo, de aproximadamente 5 μ l a aproximadamente 50 μ l. El recipiente puede tener un diámetro interno ancho en una porción superior para contener la muestra y la mayor parte del lecho amortiguador de densidad, y un diámetro interno más estrecho en una porción inferior donde se recoge el sedimento de

microorganismos. La porción estrecha puede tener un diámetro interno de aproximadamente 1,016 a aproximadamente 3,048 mm. La porción ancha puede tener un diámetro interno de aproximadamente 8,128 a aproximadamente 10,16 mm. Para separaciones a microescala, los diámetros internos pueden ser aún más pequeños. Por ejemplo, el diámetro interno de la porción estrecha puede ser de aproximadamente 0,0254 a aproximadamente 1,016 mm. Una porción de diámetro interno ahusada puede conectar las porciones superior e inferior. La porción ahusada puede tener un ángulo de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 grados, por ejemplo, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 grados. La porción estrecha inferior puede tener menos de la mitad de la altura total del recipiente, por ejemplo, menos de aproximadamente el 40%, 30%, 20% o 10% de la altura total del recipiente. El recipiente puede tener un dispositivo de cierre fijado o puede estar roscado para aceptar un dispositivo de cierre (por ejemplo, una tapa) para que el recipiente pueda ser herméticamente sellado durante la centrifugación. El recipiente puede ser diseñado para que la muestra o sedimento de microorganismos pueda ser fácilmente recuperado o, en cualquier caso, obtenido o retirado del recipiente después de la separación, ya sea manualmente o ya sea de un modo automatizado (para que los técnicos no estén expuestos a los contenidos del recipiente). Por ejemplo, el recipiente puede comprender una porción extraíble o una porción desprendible que contenga el sedimento y que pueda ser separada del resto del recipiente. El recipiente puede comprender medios para acceder al sedimento después de la separación, tal como uno o más puertos o superficies permeables para la inserción de una jeringa u otro dispositivo de muestreo o para sacar el sedimento. El recipiente puede ser un tubo, por ejemplo, un tubo de centrífuga, un chip o una tarjeta. El recipiente puede ser un recipiente independiente, es decir, un dispositivo para separar una sola muestra, o parte de un dispositivo que comprende dos o más recipientes de separación para que se puedan separar múltiples muestras al mismo tiempo. El dispositivo puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84, 96 o más recipientes de separación.

Operación de examen

El sedimento puede ser recuperado y/o resuspendido y opcionalmente retirado del recipiente de separación antes del examen, o puede ser recuperado y/o resuspendido después de un examen *in situ* llevándose luego a cabo un examen ulterior. Por ejemplo, técnicas tales como las pruebas de aglutinación de látex o las pruebas de identificación fenotípica automatizadas que se pueden aplicar a microorganismos aislados pero no a un sedimento de microorganismos pueden ser llevadas a cabo sobre los microorganismos recuperados y/o resuspendidos.

Una vez que la muestra ha sido resuspendida, se saca una porción de la muestra de la suspensión y se coloca sobre una placa para su introducción en un espectrómetro de masas. Se deposita una sustancia muy absorbente en la parte superior de la muestra (por ejemplo, una matriz); este material tiene un coeficiente de absorción óptica muy elevado con respecto a la frecuencia del láser que se utiliza para ionizar la muestra (por ejemplo, para un láser de nitrógeno, la longitud de onda de emisión es 337 nm, por lo que el material absorbente tendría un coeficiente de absorción grande a una longitud de onda de 337 nm). Una vez que la muestra y la sustancia absorbente se han secado, se inserta la placa en el espectrómetro de masas. Después del tiempo necesario para desinflar la muestra (es decir, extraer los gases atmosféricos de la muestra para que esté en un entorno de 1333-666 a 1333-933 Pa), se introduce la muestra en la cámara de ionización del espectrómetro de masas. Se alinea la muestra con el sistema. Cuando se alcanza la alineación óptima, se producen pulsos del láser de nitrógeno. La absorción de la energía del láser por la matriz causa que se separe de la superficie de la placa a causa de la elevada energía depositada. Como efecto secundario, también se vaporizan y ionizan porciones de la célula microorganismo en el proceso. Estos iones son acelerados hasta una energía cinética conocida mediante la generación de un campo electrostático entre la placa y la entrada al tubo de vuelo del espectrómetro de masas (es decir, esta porción del sistema es el dispositivo discriminador de masa/carga). Todos los iones individualmente cargados, independientemente de su masa, tendrán la misma energía cinética a la entrada del tubo de vuelo pero tendrán velocidades que serán inversamente proporcionales a sus masas. A partir de aquí, los iones bajan por el tubo de vuelo hacia el detector, y los iones más ligeros llegarán antes que los iones más pesados (el tubo de vuelo es el dispositivo discriminador de masa/carga). El detector genera una carga eléctrica cada vez que un ion impacta contra él. La salida del detector es digitalizada, y la salida presenta la relación masa/carga en un eje y el número de impactos en el otro eje. Los microorganismos del sedimento son examinados utilizando técnicas de espectrometría de masas, tales como espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas con ionización por desorción y electropulverización (DESI; del inglés, desorption electrospray ionization), espectrometría de masas acoplada a cromatografía en fase gaseosa, espectrometría de masas acoplada a cromatografía en fase líquida, espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI; del inglés, electrospray ionization), y espectrometría con tubo de flujo y iones seleccionados (SIFT; del inglés, selected ion flow tube).

Se pueden realizar mediciones de control para microorganismos conocidos, lo que permite la correlación de los datos de ensayo medidos con la caracterización de los microorganismos de interés usando diversos métodos matemáticos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden comparar los datos de las muestras con mediciones de línea de base o de control utilizando sistemas informáticos conocidos por quien tiene experiencia en la técnica. Más particularmente, los datos pueden ser analizados mediante diversos métodos de análisis multivariante, tales como, por ejemplo, análisis discriminante general (GDA; del inglés, general discriminant analysis), análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLSDA; del inglés, partial least squares discriminant analysis), regresión por mínimos cuadrados parciales, análisis de componentes principales (PCA; del inglés, principal component analysis), análisis factorial paralelo (PARAFAC), análisis de redes neurales (NNA; del

inglés, neural network analysis) y/o máquina de vectores de soporte (SVM; del inglés, support vector machine). Estos métodos pueden ser empleados para clasificar microorganismos desconocidos de interés en grupos relevantes basándose en la nomenclatura existente, y/o en grupos presentes en la naturaleza basándose en el metabolismo, la patogenicidad y/o la virulencia del organismo, al diseñar el sistema para controlar, detectar y/o caracterizar el organismo del modo previamente descrito.

Se pueden utilizar medidas no espectroscópicas procedentes del sistema de detección, tales como tiempos de detección e índices de crecimiento, para facilitar la identificación de los microorganismos de la muestra o el sedimento aislados. Además, medidas obtenidas de una imagen fotográfica de la región inferior del dispositivo de separación pueden proporcionar una información valiosa sobre la identidad del producto de aislamiento, tal como el tamaño, la forma, el color y la densidad del sedimento.

No es necesario que la identificación de los microorganismos en el sedimento aislado implique la identificación de una especie exacta. La caracterización abarca la amplia categorización o clasificación de partículas biológicas así como la identificación real de una sola especie. La clasificación de un microorganismo de un sedimento aislado puede comprender la determinación de características fenotípicas y/o morfológicas del microorganismo. Por ejemplo, la caracterización de las partículas biológicas puede ser llevada a cabo basándose en diferencias observables, tales como la composición, la forma, el tamaño, la agregación y/o el metabolismo. Puede que la clasificación de las partículas biológicas de interés no requiera un conocimiento previo de las características de una partícula biológica dada sino que sólo requiera correlaciones coherentes con mediciones empíricas, lo que haría que este método fuera más general y fácilmente adaptable que los métodos basados en procesos de unión específicos o reacciones metabólicas específicas. Como se emplea en esta memoria, "identificación" significa determinar a qué familia, género, especie y/o cepa pertenece un microorganismo previamente desconocido. Por ejemplo, identificar un microorganismo previamente desconocido a nivel de familia, género, especie y/o cepa.

En algunos casos, la caracterización abarca modelos de clasificación que proporcionan suficiente información útil sobre la acción que hay que tomar. Como se emplean en esta memoria, los modelos de clasificación preferidos comprenden el agrupamiento en uno o más de los grupos siguientes: (1) Grupos Gram; (2) Grupos Gram Clínicos; (3) Grupos Terapéuticos; y (4) Grupos Funcionales.

(1) Grupos Gram: dentro de la clasificación de Grupos Gram, los microorganismos pueden ser colocados en una de las tres amplias categorías de clasificación basándose en su reacción por tinción de Gram y su tamaño global, grupos que son seleccionados de entre uno o más de los siguientes: (a) microorganismos Gram positivos que se tiñen de color azul oscuro con tinción de Gram; (b) microorganismos Gram negativos que se tiñen de color rojo con tinción de Gram; y (c) células de levadura que se tiñen de color azul oscuro con tinción de Gram pero son células redondeadas muy grandes que se distinguen de las bacterias por su tamaño y sus características morfológicas.

(2) Grupos Gram Clínicos: los Grupos Gram pueden ser adicionalmente divididos en varias subcategorías que representan características morfológicas distintivas. Estas subcategorías comprenden toda la información clínica relevante presentada por un tecnólogo de laboratorio experimentado y, por lo tanto, proporcionan un mayor nivel de identificación que una reacción de Gram positiva o negativa. Esta clasificación particular es muy útil porque elimina problemas relativos a la dependencia de la calidad de una tinción de Gram y/o del nivel de experiencia del técnico que lee el frotis al proporcionar una información clínicamente relevante equivalente con un sistema automatizado. Más específicamente, las subcategorías de microorganismos basadas en este modelo de clasificación pueden ser seleccionadas de entre una o más de las siguientes: (a) cocos, que son células redondeadas pequeñas; (b) diplococos, que son dos células redondeadas pequeñas unidas entre sí; (c) bastones, que son de forma rectangular; y (d) bacilos, que tienen forma de bastón. Los ejemplos de estas subcategorías que se pueden determinar mediante una información morfológica adicional incluyen: (i) cocos Gram positivos; (ii) cocos Gram positivos en cadenas; (iii) cocos Gram positivos en agregados (es decir, agregados de "tipo racimo"); (iv) diplococos Gram positivos; (v) bastones Gram positivos; (vi) bastones Gram positivos con endosporas; (vii) bastones Gram negativos; (viii) cocobacilos Gram negativos; (ix) diplococos Gram negativos; (x) levaduras; y (xi) hongos filamentosos.

(3) Grupos Terapéuticos: los grupos terapéuticos comprenden múltiples especies microbianas que, cuando se aíslan de tipos de muestra particulares, son tratadas con la misma clase de antibióticos o mezcla de antibióticos (por ejemplo, como se describe en "*Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2008*"). En muchos casos, la identidad a nivel de especie no es requerida por el clínico para permitir un cambio de la terapia empírica inicial a una terapia más dirigida porque más de una especie puede ser tratada con la misma elección de antibiótico(s). Este nivel de clasificación coloca correctamente estos microorganismos de "igual tratamiento" en categorías terapéuticas individuales. Los ejemplos de este nivel de caracterización incluyen la capacidad para distinguir especies de la familia Enterobacteriaceae (EB) muy resistentes de especies EB sensibles (*Enterobacter* spp. de *E. coli*), o especies de *Candida* resistentes a fluconazol (*C. glabrata* y *C. kruzei*) de especies de *Candida* sensibles (*C. albicans* y *C. parapsilosis*), y así sucesivamente.

(4) Grupos Funcionales: los microorganismos pueden ser también dispuestos en diversos grupos basándose en una mezcla de características metabólicas, de virulencia y/o fenotípicas. Los organismos no fermentativos pueden ser distinguidos claramente de los fermentativos. Además, las especies de microorganismo que producen hemolisinas pueden ser agrupadas separadamente de las especies no hemolíticas. En algunos casos, estos grupos representan

categorías más amplias que a nivel de género (por ejemplo, bacterias coliformes y bastones Gram negativos no fermentativos), algunas a nivel de género (por ejemplo, *Enterococcus* y *Candida*), y algunas con más proximidad a una discriminación a nivel de especie (por ejemplo, estafilococos coagulasa-negativos, estreptococos alfa-hemolíticos, estreptococos beta-hemolíticos, y estafilococos coagulasa-positivos, es decir, *S. aureus*).

- 5 El uso de agentes identificadores adicionales puede facilitar el proceso de separación y/o identificación. Se pueden utilizar agentes que se unen a microorganismos específicos, tales como ligandos de afinidad, para separar microorganismos, identificar una clase o especie de microorganismo (por ejemplo, por medio de la unión a una proteína o receptor superficial único) y/o identificar una característica del microorganismo (por ejemplo, la resistencia a antibióticos). Los agentes identificadores útiles incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de los mismos (por ejemplo, anti-Eap para la identificación de *S. aureus*), sondas de ácido nucleico, antibióticos (por ejemplo, penicilina, vancomicina y polimixina B), aptámeros, compuestos peptidomiméticos, proteínas ligantes derivadas de fago, lectinas, biomarcadores de inmunidad innata del huésped (proteínas de fase aguda, proteína ligante de LPS, CD14, lectina ligante de manosa, receptores de tipo Toll), péptidos de defensa del huésped (por ejemplo, defensinas, catelicidinas, proteogrinas y magaininas), bacteriocinas (por ejemplo, lantibióticos, tales como nisina, mersacidina, epidermina, gallidermina y plantaricina C, y péptidos de clase II), bacteriófagos, y colorantes selectivos para ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, polisacáridos, cápsulas/glicocálices o proteínas, o cualquier combinación de los mismos.

- 20 Si el agente no proporciona por sí mismo una señal detectable, puede ser etiquetado para que proporcione una señal detectable, tal como al conjugar el agente con un compuesto compatible con la matriz. El agente puede ser añadido a los microorganismos en cualquier operación de los métodos de la invención, por ejemplo, cuando se obtiene la muestra, durante la lisis y/o durante la separación. En algunas realizaciones, la presencia del agente en el sedimento puede ser determinada durante el examen del sedimento. Otros agentes identificadores útiles incluyen sustratos para enzimas microbianas, agentes quelantes y compuestos tóxicos.

- 25 El sedimento puede ser recuperado separando el medio de la muestra y el lecho amortiguador de densidad por aspiración o insertando una jeringa en el recipiente y aspirando el sedimento mientras el medio de la muestra y el lecho amortiguador de densidad permanecen intactos. El sedimento recuperado puede ser luego resuspendido en un medio adecuado, por ejemplo, disolución salina. Una vez resuspendidos, los microorganismos pueden ser sometidos a cualesquier pruebas adicionales que se deseen, como es sabido por quienes tienen experiencia en la técnica. En particular, cualquier prueba que requiera muestras limpias de microorganismos puede ser llevada a cabo con los microorganismos resuspendidos. Se podrían llevar a cabo pruebas de identificación adicionales tales como Vitek[®] 2, pruebas de ácido nucleico multiplicado y no multiplicado (NAT), ensayos cromogénicos y de aglutinación de látex, inmunoensayos (por ejemplo, empleando anticuerpos etiquetados y/u otros ligandos), espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas MALDI-TOF) y/u otras técnicas ópticas tales como espectroscopía infrarroja (FTIR) y espectroscopía Raman. También podrían llevarse a cabo pruebas de caracterización adicionales, tal como la resistencia a antibióticos y/u otros fármacos, que podrían ser parte de una prueba que se iniciara durante las operaciones iniciales de separación e identificación del método. Por ejemplo, la detección de bacterias *S. aureus* resistentes a meticilina puede comenzar añadiendo penicilina etiquetada a la muestra antes de la separación de los microorganismos. Una vez que el sedimento ha sido recuperado y resuspendido, se puede determinar el nivel de etiqueta unida.

- 40 Algunas o todas las operaciones del método pueden ser automatizadas. La automatización de las operaciones del método no sólo permite que se examinen más rápidamente más muestras sino que también reduce los riesgos de errores humanos al manipular muestras que pueden contener microorganismos nocivos y/o infecciosos.

- 45 También se describe que el método de detección puede ser empleado para controlar muestras en cuanto a su contaminación por microorganismos, por ejemplo, productos alimenticios, productos farmacéuticos, agua potable, etc. El método puede ser llevado a cabo de un modo repetitivo para el control constante de la contaminación, por ejemplo, una vez al mes, una vez a la semana, una vez al día, una vez a la hora o según cualquier otro patrón temporal. Se pueden examinar muestras según se necesite, por ejemplo, cuando se sospecha una contaminación. El método de detección puede ser empleado para buscar la presencia de microorganismos en muestras clínicas, por ejemplo, en cultivos de sangre. Por ejemplo, se puede extraer una muestra de un cultivo de sangre en ciertos momentos y se puede llevar a cabo el método de detección sobre la muestra para determinar si el cultivo de sangre es positivo. Se puede tomar una muestra en un momento establecido después de la inoculación del cultivo, por ejemplo, 24 horas después de la inoculación, para determinar si el cultivo de sangre es positivo. Se pueden tomar muestras del cultivo de sangre regularmente, por ejemplo, cada 12, 6, 4 o 2 horas o cada 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 o 5 minutos, para identificar cultivos de sangre positivos a muy corto plazo de ser detectablemente positivos.

- 55 Algunas o todas las operaciones del método pueden ser automatizadas. La automatización de las operaciones del método permite que se examine más eficazmente un mayor número de muestras y reduce los riesgos de errores humanos al manipular muestras que pueden contener microorganismos nocivos y/o infecciosos. Sin embargo, es de mayor importancia que la automatización puede proporcionar resultados críticos en cualquier momento del día o la noche sin retraso. Diversos estudios han mostrado que una identificación más rápida de los organismos que causan sepsis se correlaciona con una atención al paciente mejorada, estancias hospitalarias más cortas y menores costes globales.

La presente invención se detalla adicionalmente en los ejemplos siguientes, que se presentan a modo de ilustración y con los que no se pretende limitar la invención en modo alguno. Se utilizan técnicas estándares bien conocidas en este campo técnico o las técnicas específicamente descritas más adelante.

Ejemplos

- 5 Ejemplo 1. Método de lisis-centrifugación para la identificación de microorganismos de cultivos de sangre mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Se "sembró" un pequeño inóculo de microorganismos en frascos BacT/ALERT[®] SA que contenían 10 ml de sangre humana. Se extrajeron muestras del caldo de cultivo sanguíneo de los frascos a los pocos minutos de ser etiquetado positivo mediante el Sistema de Detección Microbiana BacT/ALERT[®] 3D. Se procesaron las muestras del caldo para separar los microorganismos de los componentes de la sangre y el medio que pudieran interferir en el análisis subsiguiente, del modo siguiente:

10 Se combinaron 4,0 ml de caldo de cultivos sanguíneos recién positivos con 2,0 ml de Tampón de Lisis (Brij[®] 97 al 0,45% en CAPS 0,3 M, pH de 11,7), se mezclaron durante 5 segundos con formación de remolinos y luego se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 90 segundos. Después de la incubación, se dispuso una capa de 0,95 ml de lisado en la parte superior de un lecho amortiguador de densidad de 0,5 ml (iohexol al 14% en peso/volumen, Pluronic F-108 al 0,005% en Hepes 10 mM, pH de 7,4) en cada uno de cuatro tubos de centrifuga cónicos de 1,5 ml de capacidad. Luego se centrifugaron los cuatro tubos durante 2 minutos a 10.000 x g a 25 °C para que sedimentaran los microorganismos a través del lecho amortiguador de densidad. La sangre lisada y el medio permanecieron por encima del lecho amortiguador.

20 Después de la compleción del ciclo de la centrifuga, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los microorganismos sedimentados de cada tubo con 10 µl de agua purificada. Los microorganismos resuspendidos de los 4 tubos fueron reunidos en un tubo limpio y fueron mezclados suavemente. Luego se ajustó el volumen de cada muestra procesada para que la densidad óptica a 660 nm (A_{660}) de la suspensión final fuera igual a 20/cm. Las muestras procesadas fueron almacenadas a 2-8 °C para un examen en el mismo día o fueron divididas en partes alícuotas y congeladas a -70 °C para un examen en fecha posterior.

Ejemplo 2. Análisis de muestras de microorganismos procesadas a partir de cultivos sanguíneos positivos con lisis-centrifugación por MALDI-TOF MS

30 Se descongelaron rápidamente a 37 °C muestras procesadas de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 (si se habían congelado previamente), se mezclaron suavemente y luego se diluyeron hasta la fuerza de uso (1:4, 1:8 y 1:16) en agua purificada. Se aplicaron 1,0 µl de cada muestra diluida, por duplicado, a una placa objetivo para MALDI-TOF. Se añadieron 1,0 µl de ácido fórmico al 50% a uno de cada uno de los duplicados. Se dejó que se secaran a la temperatura ambiental todas las muestras aplicadas y luego se aplicaron 1,0 µl de disolución de matriz. La matriz consistía en una mezcla 50:50 de Alpha-Cyano (disolución de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico; AnagnosTec GmbH, Alemania) y DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico; AnagnosTec GmbH, Alemania).

35 Por comparación, los correspondientes productos de aislamiento microbianos fueron cultivados en un medio de agar que era apropiado para la especie y fueron extendidos directamente sobre la placa objetivo para MALDI-TOF por duplicado. Los microorganismos de una de las manchas duplicadas fueron resuspendidos *in situ* con 1,0 µl de agua purificada, seguidos de 1,0 µl de ácido fórmico al 50%. Se dejó que se secaran ambas manchas de un producto de aislamiento dado y luego se añadieron 1,0 µl de mezcla de matriz a cada una.

40 Una vez que se hubieron secado completamente todas las muestras de microorganismos, se adquirieron espectros de masas de cada una por MALDI-TOF a lo largo de un intervalo de masa/carga de 2000-34.000 en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Axima Assurance (Shimadzu Biotech North America, Maryland, EE.UU.).

45 En las Figuras 1-3 se muestran espectros de masas representativos de microorganismos seleccionados recuperados de cultivos de sangre positivos. El intervalo de masa/carga de las figuras ha sido reducido por claridad, pero los mismos hallazgos ilustrados en estas figuras se mantienen en todos los intervalos de masas.

50 En la Figura 1 se muestran espectros de microorganismos procesados a partir de cultivos sanguíneos de siembra de cinco productos de aislamiento clínicos, promediados para claridad de la ilustración, para cada una de cuatro especies. Las acusadas diferencias en cuanto a presencia o ausencia de picos para una relación dada de masa/carga son enseguida evidentes y características de estos organismos. No hay picos de masa/carga comunes a todos los espectros, lo que indica que pocas, si acaso alguna, masas potencialmente encubridoras están presentes como resultado del arrastre de sangre o medio de cultivo después del procesamiento de acuerdo con la presente invención.

55 En la Figura 2 se muestran los cinco espectros de masas individuales de los productos de aislamiento de *S. aureus* que se mostraron promediados en la Figura 1. Los cinco espectros muestran la consistencia del espectro de masas para este microorganismo a través de diferentes productos de aislamiento clínicos, incluso cuando se desarrollan en diferentes cultivos de sangre con diferentes donantes de sangre.

En la Figura 3 se muestran los espectros promediados de los cinco productos de aislamiento de *E. coli* mostrados en la Figura 1, comparados con los espectros de los mismos cinco productos de aislamiento directamente muestreados de colonias desarrolladas en un medio de agar (agar de soja triptico con sangre de oveja al 5%, bioMérieux Inc.). La similitud de los espectros de masas muestra que el procesamiento de los cultivos de sangre elimina eficazmente materiales que no son de origen microbiano mientras se conservan aquellas masas que son específicas del microorganismo.

Ejemplo 3. Identificación de muestras de microorganismos procesadas a partir de cultivos sanguíneos positivos con lisis-centrifugación por MALDI-TOF MS y una base de datos comercialmente asequible para identificación de microorganismos

Se desarrollaron, procesaron y sometieron a análisis de masas, como se describió en los Ejemplos 1 y 2, ciento veintitrés productos de aislamiento de microorganismos. Los microorganismos comprendían 14 especies de bacterias y levaduras, comúnmente detectadas en cultivos de sangre clínicos.

Después de la adquisición de cada espectro de masas, se introdujo una tabla de picos de masas en el software "Saramis" de identificación de microorganismos (AnagnosTec GmbH, Alemania) para su análisis. Este software está construido sobre una base de datos de espectros de masas MALDI-TOF recogidos de microorganismos desarrollados en agar.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de todos los productos de aislamiento desarrollados tanto en cultivo de sangre como sobre un medio de agar, en paralelo, a partir de los mismos cultivos de siembra. Los resultados de la Tabla 1 están tabulados para todos los cultivos aunque, para algunos productos de aislamiento, la concentración de células en la suspensión final estaba por debajo de la concentración objetivo especificada en el Ejemplo 1. En los casos en que la concentración de células era inferior al 20% del valor objetivo, se retiraron esos productos de aislamiento de la tabulación y se volvieron a compilar los resultados de los productos de aislamiento restantes en la Tabla 2. En la práctica, los cultivos con números de células bajos pueden ser compensados reduciendo el volumen de la resuspensión del sedimento o procesando un mayor volumen de caldo de cultivo.

Las columnas "Correcto para especie" de las Tablas 1 y 2 se refieren al número de productos de aislamiento en que al menos uno, y normalmente más, de los espectros de un conjunto de manchas objetivo para un producto de aislamiento dado es identificado correctamente como una sola especie, o como un grupo de dos o tres especies íntimamente relacionadas, con un nivel de confianza de al menos 90%. Asimismo, se considera que el producto de aislamiento está correctamente identificado a nivel de género o familia si los espectros se corresponden con la base de datos con una confianza de al menos 90% en relación con el género o la familia correctos, pero sin indicación de especie. Las columnas "Sin ID/ID incorrecta" son los productos de aislamiento que produjeron espectros de masas que tenían generalmente demasiada poca calidad para una ID adecuada, lo que daba lugar a una identificación no fiable o, raras veces, a una identificación falsa. Se consideró que estos criterios son razonables para este estudio, pero el software proporciona al usuario experto la libertad para ajustar criterios de confianza de identificación apropiados a las necesidades individuales.

El éxito de la identificación microbiana por la presente invención, casi un 95% correcta a nivel de especie, es claramente superior al de los estudios previos llevados a cabo con métodos de procesamiento previamente conocidos en los que se ha comunicado una identificación correcta < 76% (véase, por ejemplo, T. Maier et al., "Rapid Identification of Bacteria from Blood Cultures Using MALDI-TOF MS", Poster ICAAC 48th Annual Meeting, 2008; véase también, por ejemplo, Drake et al., "MALDI-TOF Mass Spectrometry Based Identification of Clinically Important Microorganisms", ASMS Poster, Philadelphia 2009). Para la identificación de microorganismos a partir de un cultivo de sangre se podría emplear cualquier número de modelos matemáticos o bases de datos de espectros, pero estos resultados con una base de datos comercial muestran mejor que microorganismos procesados por la presente invención a partir de un cultivo de sangre están suficientemente exentos de picos de masas contaminantes para corresponderse con una base de datos, desarrollada en agar, de espectros de colonias "puras".

Tabla 1: Todos los productos de aislamiento

	Correcto para especie	Correcto para género/familia	Sin ID/ID incorrecta	N
Cultivo de sangre	112 (91,1%)	116 (94,3%)	7 (5,7%)	123
Colonias sobre agar	113 (91,9%)	118 (95,9%)	5 (4,1%)	123

Tabla 2. Productos de aislamiento que satisfacen los criterios de masa de células

	Correcto para especie	Correcto para género/familia	Sin ID/ID incorrecta	N
Cultivo de sangre	108 (94,7%)	112 (98,2%)	2 (1,8%)	114
Colonias sobre agar	104 (91,2%)	109 (95,6%)	5 (4,4%)	114

5 Los ejemplos precedentes son ilustrativos de la presente invención y no han de ser considerados restrictivos de la misma. La invención se define mediante las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar microorganismos de una muestra de sangre, que comprende:
 - (a) obtener una muestra de sangre de la que se sabe que contiene o puede contener microorganismos;
 - 5 (b) lisar y solubilizar selectivamente células no microorganismo en dicha muestra de sangre con una disolución de lisis para producir una muestra lisada, disolución de lisis que tiene un pH de 8 a 13;
 - (c) poner una capa de dicha muestra lisada sobre un lecho amortiguador de densidad que tiene una densidad homogénea de 1,025 a 1,120 g/ml en un recipiente y centrifugar el recipiente para separar dichos microorganismos de otros componentes de dicha muestra lisada, microorganismos que atraviesan dicho lecho amortiguador de densidad para formar un sedimento de dichos microorganismos en el fondo de dicho recipiente;
 - 10 (d) examinar dicho sedimento de dichos microorganismos por espectrometría de masas para adquirir un espectro de masas de dichos microorganismos: y
 - (e) identificar dichos microorganismos en dicho sedimento de muestra aislado por comparación del espectro de masas medido con espectros de masas de referencia y/o con las masas conocidas o previstas de componentes celulares de microorganismos conocidos, en donde dichos microorganismos son identificados a nivel de familia, nivel
 - 15 de género, nivel de especie y/o nivel de cepa.
2. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha muestra de sangre procede de un cultivo de sangre.
3. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde al menos una porción de dicho sedimento de dichos microorganismos de la operación (c) es recuperada y puesta sobre un sustrato de soporte antes de dicha operación (d) de examen.
- 20 4. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicha espectrometría de masas es seleccionada del grupo que consiste en espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas con ionización por desorción y electropulverización (DESI), espectrometría de masas acoplada a cromatografía en fase gaseosa, espectrometría de masas acoplada a cromatografía en fase líquida, espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI), y espectrometría con tubo de flujo y iones seleccionados (SIFT).
- 25 5. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicha identificación comprende además la caracterización de dichos microorganismos basándose en una o más características fenotípicas y/o morfológicas.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicha identificación comprende además la caracterización de dichos microorganismos en uno o más modelos de clasificación seleccionados del grupo que consiste en Grupos Gram, Grupos Gram Clínicos, Grupos Terapéuticos y Grupos Funcionales.
- 30 7. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicha operación (b) de lisis selectiva se lleva a cabo utilizando una disolución de lisis que comprende uno o más detergentes, en donde dicho uno o más detergentes es preferiblemente Triton[®] X-100, Triton[®] X-100-R, Triton[®] X-114, NP-40, Genapol[®] C-100, Genapol[®] X-100, Igepal[®] CA 630, Arlasolve[™] 200, Brij[®] 96/97, CHAPS, octil-β-D-glucopiranosido, saponina, nonaetilenglicol-monododecil-éter (C12E9, polidocanol), dodecilsulfato sódico, N-laurilsarcosina, desoxicolato sódico, sales biliares, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, SB3-10, SB3-12, amidosulfobetaina-14, C7BzO, Brij[®] 98, Brij[®] 58, Brij[®] 35, Tween[®] 80,
 - 35 Tween[®] 20, Pluronic[®] L64, Pluronic[®] P84, sulfobetainas no detergentes (NDSB 201), anfipoles (PMAL-C8), metil-β-ciclodextrina, o un detergente de polioxietileno que comprende la estructura C₁₂₋₁₈/E₉₋₁₀.
8. El método de la Reivindicación 7, en donde dicha disolución de lisis comprende además una o más enzimas, comprendiendo dichas una o más enzimas una mezcla de una o más proteinasas y una o más nucleasas, y/o uno o
 - 40 más agentes de tamponamiento.
9. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho lecho amortiguador de densidad comprende uno o más de entre sílice coloidal, agentes de contraste yodados, sacarosa, aceite de inmersión para microscopio, aceite mineral, aceite de silicona, aceite de fluorosilicona, gel de silicona, metrizoato-Ficoll[®], diatrizoato-dextrano, carboximetil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, poli(óxido de etileno) (alto peso molecular), Pluronic[®] F127,
 - 45 Pluronic[®] F68, poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico) reticulado, polivinilpirrolidina reticulada, metacrilato de PEG-metil-éter, pectina, agarosa, xantano, gellan, Phytigel[®], sorbitol, Ficoll[®], glicerol, dextrano, glucógeno, cloruro de cesio, fluidos perfluorocarbonados, fluidos hidrofluorocarbonados, y combinaciones de los mismos.
10. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicha muestra de sangre es una muestra de cultivo de sangre de la que se sabe que contiene microorganismos.

50

Figura 1

Espectros de masas de productos de aislamiento recuperados de cultivos de sangre

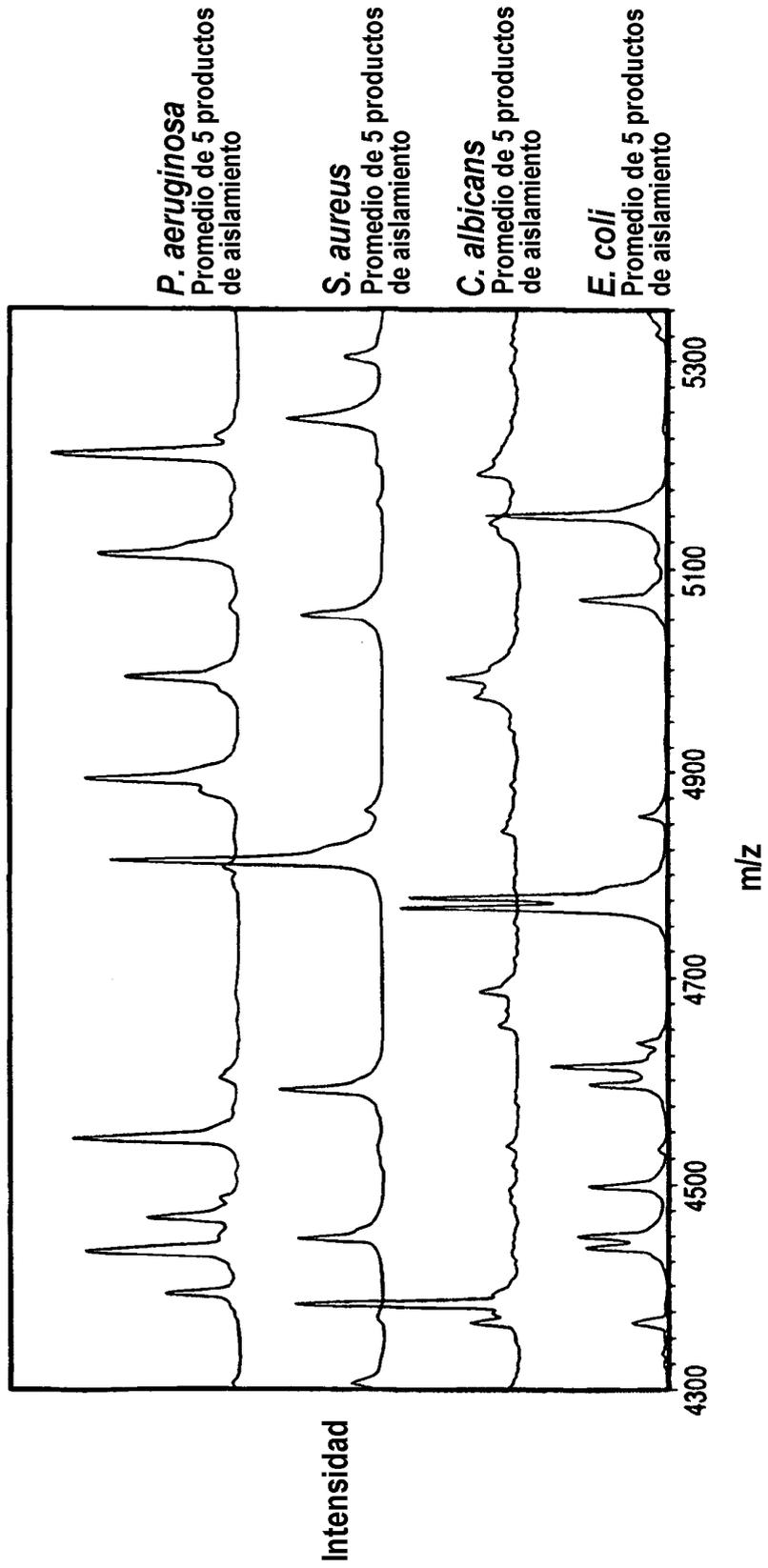


Figura 2

Espectros de masas de 5 productos de aislamiento de *S. aureus* recuperados de cultivos de sangre

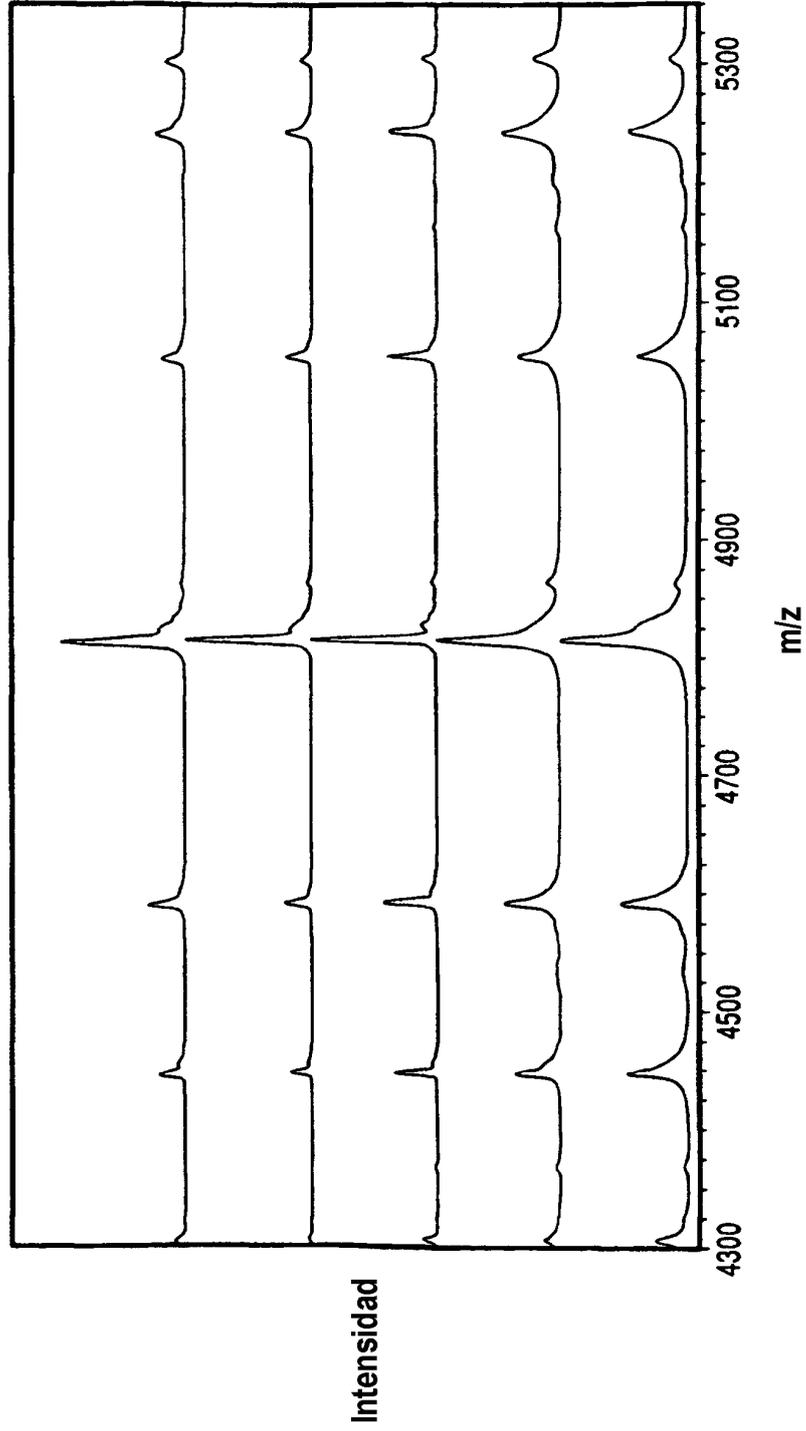


Figura 3

