

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 267**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2013 PCT/PL2013/000109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2013 E 13774254 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2888364**

54 Título: **Método para el aislamiento eficiente del ADN microbiano de la sangre**

30 Prioridad:

**24.08.2012 PL 40050112**

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

**01.02.2018**

73 Titular/es:

**UNIWERSYTET JAGIELLONSKI (100.0%)  
Ul. Golebia 24  
31007 Krakow, PL**

72 Inventor/es:

**GOSIEWSKI, TOMASZ y  
BRZYCHCZY-WLOCH, MONIKA**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

ES 2 652 267 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

Método para el aislamiento eficiente del ADN microbiano de la sangre

El objetivo de la invención es un nuevo método para aislar ADN microbiano de muestras de sangre para obtener un material de alta calidad para PCR de diagnóstico molecular.

5 El diagnóstico microbiológico de la sangre es uno de los desafíos diagnósticos más problemáticos. La presencia de bacterias (bacteriemia) u hongos (fungemia) en la sangre muy a menudo resulta en sepsis: inflamación sistémica causada por la infección.

10 La sepsis es uno de los problemas más urgentes de la medicina moderna. La mortalidad causada por la sepsis de etiología bacteriana o fúngica es muy alta en Polonia [Martin G.S., Mannino D.M., i Moss M., The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 2003. 348: str. 1546-1554; Zieliński A. i Czarkowski M.P., Choroby zakaźne w Polsce con 2005 roku. *Przegl Epidemiol*, 2007. 61: str. 177-187].

15 Lever et al informaron que más de 750.000 personas se contagian y más de 750.000 personas mueren cada año debido a la sepsis en los Estados Unidos [Lever A. and M. I., Sepsis: definition, epidemiology and diagnosis. *Clinic Rev*, 2008. 335(27):879-883]. En la Unión Europea hay más de 146.000 casos mortales cada año debido a una sepsis grave. En el Reino Unido, solo la mortalidad oscila entre 30 a 50/100.000 por año, lo que coloca a la sepsis entre las diez principales causas de muerte [Zielinski A. y Czarkowski M.P., 2007]. Además, incluso en los países desarrollados, la sepsis ocurre en 2-4 recién nacidos por cada 1.000 y es la principal causa de muerte en recién nacidos [Baltimore R.S., Neonatal sepsis: epidemiology and management. *Pediatr Drugs*, 2003. 5(11):723-740; Watson R.S. and Carcillo J.A., Scope and epidemiology of pediatric sepsis. *Pediatr Crit Care Med*, 2005. 6(3):3-5]. En Polonia, no hay datos epidemiológicos precisos, pero Zielinski et al. indican que en 2005 hubo 967 muertes (incluidas 43 muertes en la infancia) debido a la sepsis.

25 El problema más importante y más difícil en el tratamiento de las infecciones del torrente sanguíneo, la determinación de la efectividad de la terapia y, en consecuencia, el coste y el tiempo de hospitalización, es el diagnóstico eficaz de los factores responsables de la respuesta inflamatoria sistémica en el curso de la sepsis. La determinación de factores etiológicos permite la selección de la terapia antibiótica más adecuada. El material sometido a pruebas de diagnóstico es la sangre tomada del paciente que muestra signos clínicos de sepsis. Actualmente, el método de diagnóstico "estándar de oro" es la prueba de crecimiento microbiano después de la inoculación en medios de cultivo específicos para grupos de patógenos seleccionados. Este método es relativamente simple y económico, pero también requiere mucho tiempo: los resultados pueden estar disponibles tan tarde como en 5 días.

30 Además, la identificación de patógenos con este método a menudo falla debido a la baja sensibilidad; el crecimiento microbiano puede detectarse solo en alrededor del 15-20% de los cultivos [Jamal W. et al., Evaluación comparativa de los sistemas BacT/ALERT 3D y BACTEC para la recuperación de patógenos que causan infecciones del torrente sanguíneo. *Med Princ Pract*, 2006. 15(3):223-227].

35 La detección de agentes microbiológicos en la sangre puede mejorarse utilizando métodos de detección molecular con base en la reacción en cadena de la polimerasa. La sensibilidad de los métodos moleculares es mucho más alta que en el caso de los métodos de cultivo. Además, la aplicación temprana de la terapia con antibióticos no afecta los resultados de la prueba debido al hecho de que no es necesario el crecimiento de bacterias u hongos en el medio de cultivo, sino solo una detección de la secuencia de ADN o ARN [Klouché M. and Schroder U., Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med*, 2008. 46(7):888-908].

40 El método clásico para aislar ADN de las células es que el material de partida se toma en condiciones desnaturalizantes y reductoras, a menudo usando al mismo tiempo enzimas que degradan las proteínas, y las fracciones de ácidos nucleicos se purificaron por extracción con fenol cloroformo, y es separado de la fase acuosa usando diálisis o precipitación con alcohol [Sambrock J., Fritsch E.F., Maniatis T, 1989, CSH, "Molecular Cloning"]. Sin embargo, este método requiere mucho trabajo y requiere mucho tiempo, y requiere el uso de solventes orgánicos, particularmente el fenol tóxico.

45 El método propuesto en la patente de los Estados Unidos No. 2011300608 proporciona un aislamiento total del ADN sin el uso de disolventes tóxicos. De acuerdo con este método, se suspende una muestra de sangre en una mezcla de anticoagulante y un agente de fijación, y se mezcla una muestra con el regulador de lisis de eritrocitos. En el siguiente paso, la muestra se mezcla con regulador de lisis nuclear, y luego con proteinasa K y alcohol. El regulador de lisis de eritrocitos incluye cloruro de amonio, bicarbonato de amonio y un agente quelante tal como EDTA.

50 También en la solicitud de patente WO02055737 existe un método que evita el uso de disolventes tóxicos y sales caotrópicas. De acuerdo con esta invención, se lleva a cabo la lisis de glóbulos rojos, y los glóbulos blancos se eliminan de la mezcla, se lavan y luego se lisan. Después de eso, se precipita una proteína de la mezcla. Todos los pasos mencionados anteriormente se llevan a cabo usando las soluciones acuosas. El regulador de lisis de eritrocitos consiste en cloruro de amonio, bicarbonato de sodio y EDTA. La solución de lisis de leucocitos contiene un agente tensoactivo tal como laurilsulfato de sodio. La solución utilizada para la precipitación de proteína contiene una sal orgánica tal como el acetato de amonio.

Los métodos descritos anteriormente se usan para el aislamiento de ADN eucariota, por ejemplo de los leucocitos, pero estos métodos no son efectivos en el caso de los hongos debido a una composición química diferente de su pared celular. Se ha descrito un método similar de aislamiento de ADN de hongos en la solicitud de patente de Estados Unidos US2002115077. Este método se lleva a cabo en los siguientes pasos: desintegración de las células sanguíneas, aislamiento de las células fúngicas intactas, desintegración de las células fúngicas aisladas y aislamiento del ADN fúngico. Una desintegración preliminar de los eritrocitos se lleva a cabo mediante la hemólisis osmótica y la desintegración de los leucocitos mediante la digestión enzimática. La desintegración de las células fúngicas se lleva a cabo mediante el tratamiento con lisis alcalina y la enzima. El aislamiento del ADN fúngico se lleva a cabo precipitando la proteína usando acetato de potasio y luego precipitando el ADN del sobrenadante con isopropanol frío. El ADN obtenido por este método es adecuado para la amplificación usando el método de PCR.

Desafortunadamente, los métodos de biología molecular también tienen limitaciones para realizar el diagnóstico microbiológico de la sangre. La dificultad es aislar la plantilla de ADN de calidad adecuada y alta concentración. Las células de bacterias y hongos muestran diferente susceptibilidad a la lisis, que es un requisito previo para obtener ADN de ellos. Las bacterias se dividen en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas: se relacionan con la construcción de la pared celular. En el caso de las bacterias, la pared celular de la especie del grupo Gram-positivo es más gruesa y resistente a la degradación, lo que hace necesario utilizar una lisis enzimática especial (lisozima, mutanolisina y/o lisostafina). Por otro lado, la pared celular de los hongos tiene una composición química completamente diferente a la de la pared bacteriana, por lo que los procedimientos estándar utilizados con las bacterias fallan. Además, las paredes celulares de hongos similares a levaduras y hongos de moho son estructuralmente diferentes, lo que complica en gran medida el proceso de aislamiento del ADN.

El diagnóstico molecular también se ve afectado por hemo presente en la sangre, que es un potente inhibidor de las ADN polimerasas utilizadas en los métodos de PCR [Abu Al - Soud P. and Randstrom P., Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol*, 2001. 39(2):485-493]. La mayoría de los procedimientos de procesamiento de sangre disponibles no permiten la eliminación completa del efecto de inhibición de PCR, que a su vez puede conducir a un resultado de diagnóstico falso negativo [Akane A., Matsubara K., and Nakamura H., Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains a major inhibitor of polymerase chain reaction amplification. *J Forensic Sci*, 1994. 37:362-372]. Hemo causa una separación de la ADN polimerasa (una desintegración del complejo enzima-sustrato) y también bloquea el bolsillo catalítico de la enzima. En la literatura hay informes sobre diferentes tipos de preparación de muestras para eliminar el efecto de la inhibición de PCR.

Típicamente, estos métodos implican una muestra o dilución de lavado de alta precisión o se agregan a la mezcla, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA), glicerol o dextrano, que son dianas adicionales para inhibidores y, por lo tanto, reducen el efecto sobre la ADN polimerasa [Kreader C., Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. *Appl. Environ. Microbiol*, 1996. 62:1102-1106; Rådström P., Abu Al-Soud P., and Lantz P., A sample preparation method which facilitates detection of bacteria in blood cultures by the polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods* 1998. 21:217-224.; Michael D., et al, Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *J Microbiol Methods*, 2003. 52: str. 389-393].

Tales actividades, sin embargo, causan una pérdida de sensibilidad del método de PCR, y por lo tanto dan como resultado un diagnóstico menos efectivo. También existe la posibilidad de elegir una enzima polimerasa específica de varias polimerasas de ADN termoestables utilizadas en PCR (Taq, Pwo, Pfu, Tfl, et al.) con la diferente sensibilidad a los inhibidores [Abu Al-Soud P., y Lantz P., 1998].

En la literatura científica y de patentes, falta la descripción del método de aislamiento de ADN de la sangre, que es eficaz tanto para las bacterias como para los hongos. Todas las descripciones disponibles solo se refieren al aislamiento de ADN eucariota de leucocitos o por separado de bacterias u hongos [Chiba N., Murayama S. Y., Morozumi M., Nakayama E, Okada T., Iwata S., Sunakawa K., Ubukata K., Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. *J Infect Chemother*, 2009. 15:92-98; Sugita S., Kamoi K., Ogawa M, Watanabe K., Shimizu N, Mochizuki M., Detection of Candida and Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012. 250:391-398; Badiie P. and Alborzi A., Detection of Aspergillus species in bone marrow transplant patients. *J Infect Dev Ctries* 2010. 4:511-516].

El producto SeptiFastLys con el dispositivo del kit MagnALyser están disponibles en el mercado desde hace unos años. El principio de la operación probablemente se basa en la degradación mecánica de las células seguida de la purificación del ADN de las proteínas con una proteasa. Después de la lisis, las muestras se incuban a una temperatura elevada con una proteasa y el regulador de lisis caotrópico. Después de la adición del regulador de enlace, la mezcla se transfiere a una columna giratoria que contiene un cartucho de filtro con fibra de vidrio. El ADN genómico humano y el ADN diana bacteriano/fúngico se enlaza a la superficie de la fibra de vidrio. Las sustancias no enlazadas, como sales, proteínas y otros contaminantes de origen celular, se eliminan en dos etapas de lavado. Después del lavado, los ácidos nucleicos adsorbidos se eluyen a una temperatura elevada. Los eluidos se someten a análisis de PCR. El regulador de lisis y el regulador de enlace tienen la misma composición y comprenden el tiocianato de guanidina, Tris-HCl (hidrocloruro de tris (hidroximetil) aminometano), un tensioactivo no iónico, éter de polímero, polietilenglicol (PEG) y p-octilfenol (Triton X- 100). La enzima es proteinasa K.

El documento WO 2012/050781 A1 divulga un método para la extracción de ácido nucleico fúngico (por ejemplo, ADN, ARN) a partir de una muestra en algunas realizaciones. Proporciona una extracción mejorada de ácidos nucleicos a partir de muestras que comprenden células fúngicas en las que el tratamiento de muestra enzimática se realiza en combinación con el tratamiento de muestras mecánicas (por ejemplo, impacto con perlas), que comprende:

- 5 a) someter dichas muestras a tratamiento enzimático (por ejemplo, lisostafina, liticase),
- b) someter dichas muestras a tratamiento mecánico (por ejemplo, impacto con perlas),
- c) extraer dicho ácido nucleico de la muestra.

Esta publicación no proporciona ninguna información sobre las preparaciones adecuadas de muestras de sangre y la eliminación de hemo, que es una etapa crucial de todo método eficiente de aislamiento de ácidos nucleicos. Por lo tanto, la solución técnica descrita en el documento WO 2012/050781 A1 no garantiza un método eficaz de aislamiento del ADN de bacterias y hongos Gram-positivos.

El documento US 7670768 B1 es un documento completo que divulga múltiples realizaciones y opciones diferentes para aislar, amplificar y caracterizar ADN a partir de materiales biológicos. El método divulgado en esta publicación no comprende la etapa de lisis mecánica y se aleja de la disrupción mecánica.

15 El documento WO 97/07238 A2 describe un método para la detección y extracción de células fúngicas en material clínico a partir de sangre completa. El proceso de aislamiento descrito en esta publicación comprende una lisis osmótica de glóbulos rojos junto con una lisis enzimática y alcalina. Sin embargo, no se divulga el uso de cloruro de amonio para lisar los glóbulos rojos y la aplicación de un tratamiento mecánico para obtener paredes celulares de hongos adecuadamente alteradas.

20 El método de la invención es una solución que permite el aislamiento simultáneo de ADN microbiano de la sangre. En este método, el aislamiento se lleva a cabo mediante la compilación de lisis enzimática, mecánica y térmica. Este enfoque permite obtener ADN de todos los tipos de organismos, independientemente de la estructura de las células.

El método de la invención incluye las siguientes etapas:

25 a) se agrega una solución acuosa de cloruro de amonio (a una concentración de 0,10-0,25 M) a la muestra de sangre completa, en una proporción de 1:3 a 1:6 en relación con el volumen de la muestra de sangre, la muestra se incuba a una temperatura de 35 °C a 40 °C desde 15 a 30 minutos, seguido de centrifugación y eliminación del sobrenadante;

b) el precipitado obtenido en la etapa (a) se suspende en una solución de lisozima a una concentración de 2 a 5 mg/ml, y la lisostafina a una concentración de 0,2 a 0,5 mg/ml en regulador PBS, la suspensión se agita en vórtex o se agita y el sobrenadante se elimina;

30 c) el material obtenido en la etapa (b) se somete a desintegración mecánica;

d) el material se incuba a una temperatura de 35 °C a 39 °C, desde 20 a 50 minutos, después de eso

35 e) se agrega una solución de NaOH o KOH (a una concentración de 0,65 a 0,8 mM), en una proporción desde 1:1 a 1:3 en relación con el volumen del material de la etapa (c), se incuba el material a una temperatura de 80 °C a 95 °C, desde 5 a 10 minutos, la suspensión se centrifuga y se elimina el sobrenadante; seguido de la adición de un regulador (pH de aproximadamente 7,5) que contiene Tris-HCL, EDTA y β-mercaptoetanol, y liticase con actividad enzimática de 30 a 50 U, la muestra se incuba a una temperatura de 35 °C a 39 °C, desde 20 a 50 minutos; y/o

f) la solución se centrifuga y el sobrenadante se elimina;

g) el ADN microbiano se aísla del precipitado obtenido en la etapa (f).

40 La etapa de desintegración mecánica (etapa c) se lleva a cabo preferiblemente usando las perlas de vidrio. En una etapa (e) se usa preferiblemente un regulador que consiste en Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM y β-mercaptoetanol 28 mM. El precipitado obtenido de esta invención se trata de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el kit de aislamiento de ADN. Por lo general, es una lisis por proteinasa K seguida de transferencia a las columnas para ADN, donde se elimina la contaminación.

45 En la presente invención, un pretratamiento de muestra de sangre con cloruro de amonio (etapa a) proporciona la interrupción (hemólisis) de los eritrocitos, lo que provoca la liberación de hemoglobina y su posterior separación con el sobrenadante. En las siguientes etapas hay trazas presentes de hemo, mientras que los restos presentes de eritrocitos en la muestra no son un obstáculo para el aislamiento eficaz del ADN. Después de la eliminación de hemo, se introducen las enzimas (lisozima y lisostafina) en la muestra, que degradan las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas. Antes de la incubación de la muestra con las enzimas se lleva a cabo una lisis mecánica, para proporcionar una interrupción adicional de las paredes celulares, tanto bacterianas como de hongos. En una etapa (e) 50 una adición de NaOH o KOH "relaja" las paredes celulares de los hongos a alta temperatura, una liticase digiere las paredes celulares de los hongos y el β-mercaptoetanol degrada las proteínas y ayuda en la operación de la digestión por liticase de las paredes fúngicas. El precipitado que contiene las células microbianas digeridas y los leucocitos se

separa en la etapa (f). El precipitado obtenido es una mezcla de ácidos nucleicos y proteínas. Este producto puede tratarse con cualquier kit de aislamiento de ADN, que consiste en la digestión y eliminación de proteínas y la determinación de ácidos nucleicos.

5 El método presentado se puede utilizar en modo completo, en el que se aísla ADN tanto bacteriano como fúngico, o en modos limitados que permiten obtener ADN solo de bacterias o solo de hongos.

10 Como resultado de la metodología desarrollada para la preparación de sangre, se obtiene un material del que se puede aislar el ADN altamente purificado de todos los microorganismos utilizando los kits comerciales de aislamiento de ADN. Los aislados de ADN obtenidos están tan bien purificados de hemo que no hay necesidad de sustancias adicionales que tengan un efecto protector sobre la ADN polimerasa utilizada en la posterior reacción de amplificación. Una ventaja adicional de la invención es que la muestra de sangre sometida a un proceso de la invención se puede purificar usando cualquier kit de aislamiento de ADN disponible comercialmente, mientras que un kit de aislamiento de ADN específico permite obtener ADN solo de bacterias u hongos o leucocitos. Los intentos de usar kits sin preparación inicial de sangre, que es el tema de la solicitud de patente, dieron como resultado la obtención de ADN con un hemo altamente contaminado y la incapacidad de obtener los ácidos nucleicos de las células fúngicas.

15 Las muestras sin pretratamiento de acuerdo con la invención y después de la preparación se procesaron adicionalmente usando cinco kits listos de aislamiento de ADN comercialmente disponibles (marcados con las siguientes letras A, B, C, D, E). En el kit A más útil, se obtuvo la sensibilidad de la indicación de microorganismos a nivel de *E. coli*:  $10^1$  CFU/ml; *S. aureus*:  $3 \times 10^2$  CFU/ml; *C. albicans*:  $4 \times 10^2$  CFU/ml; *Aspergillus* spp.  $1,2 \times 10^2$  CFU/ml.

Los resultados del ejemplo de cinco kits comerciales para aislamiento de ADN se muestran en la figura, donde:

20 La Figura 1 muestra el grado de purificación del aislado de ADN a partir de hemo después de la aplicación del pretratamiento de muestras de sangre de acuerdo con la invención y sin un pretratamiento;

25 La figura 2 muestra los valores obtenidos como resultado del parámetro de reacción de PCR C (t): el número del ciclo de reacción en el que un aumento lineal registrado del producto de amplificación corta la línea base arbitrariamente establecida (a 30 unidades de fluorescencia), para ADN de *Staphylococcus aureus*, usando un método de pretratamiento de muestra de sangre de acuerdo con la invención.

La figura 3 muestra los valores obtenidos como resultado del parámetro de reacción de PCR C (t): el número del ciclo de reacción en el que un aumento lineal registrado del producto de amplificación corta la línea base arbitrariamente establecida (a 30 unidades de fluorescencia), para ADN de *Escherichia coli*, usando un método de pretratamiento de muestra de sangre de acuerdo con la invención.

30 La figura 4 muestra los valores obtenidos como resultado del parámetro de reacción de PCR C (t): el número del ciclo de reacción en el que un aumento lineal registrado del producto de amplificación corta la línea base arbitrariamente establecida (a 30 unidades de fluorescencia), para ADN de *Candida albicans*, usando un método de pretratamiento de muestra de sangre de acuerdo con la invención.

35 La figura 5 muestra los valores obtenidos como resultado del parámetro de reacción de PCR C (t): el número del ciclo de reacción en el que un aumento lineal registrado del producto de amplificación corta la línea base arbitrariamente establecida (a 30 unidades de fluorescencia), para ADN de *Aspergillus* spp, usando un método de pretratamiento de muestra de sangre de acuerdo con la invención.

El método de la invención se describe adicionalmente en los ejemplos.

Ejemplo 1.

40 Aislamiento de ADN de cualquier especie de microorganismo de sangre:

1. agregar 1,5 ml de sangre completa a 6 ml de cloruro de amonio 0,17 M,
2. incubar las muestras durante 20 minutos a 37 °C,
3. centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm,
4. eliminar el sobrenadante,

45 5. suspender el precipitado en 100 µl de solución de lisozima (2 mg/ml) y lisostafina (0,2 mg/ml) en regulador PBS,

6. transferir las muestras a tubos con perlas de vidrio (700-1.100 µm) y sujetas a alteración mecánica durante 20 segundos a una velocidad de 4,0 m/s,

7. incubar las muestras durante 30 minutos a 37 °C,

8. agregar 200 µl de NaOH 75 mM,

50 9. incubar las muestras durante 10 minutos a 95 °C,

## ES 2 652 267 T3

10. centrifugar durante 10 minutos a 12.000 rpm,

11. eliminar el sobrenadante,

12. agregar 500 µl de regulador que consiste en Tris HCl 50 mM, EDTA 10 mM, β-mercaptoetanol 28 mM (pH = 7,5) y liticasa (5 µl de solución de reserva: 4.000 U),

5 13. incubar las muestras durante 30 minutos a 37 °C,

14. centrifugar durante 10 minutos a 12.000 rpm.

El precipitado obtenido se somete a preparaciones adicionales, usando un kit de aislamiento de ADN comercial de acuerdo con el protocolo proporcionado por el procedimiento del fabricante. El procedimiento da como resultado la obtención del ADN listo para etapas adicionales del análisis, por ejemplo, realizar una reacción de PCR para detectar microorganismos.

10

Ejemplo 2

Aislamiento de ADN bacteriano de sangre:

1. Agregar 1,5 ml de sangre completa a 6 ml de cloruro de amonio 0,17 M,

2. incubar las muestras durante 20 minutos a 37 °C,

15 3. centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm,

4. eliminar el sobrenadante,

5. suspender el precipitado en 100 µl de solución de lisozima (2 mg/ml) y lisostafina (0,2 mg/ml) en regulador PBS,

6. transferir las muestras a los tubos con perlas de vidrio (700-1100 µm) y someterlas a una alteración mecánica durante 20 segundos a una velocidad de 4,0 m/s,

20 7. incubar las muestras durante 30 minutos a 37 °C,

8. centrifugar durante 10 minutos a 12.000 rpm.

El precipitado obtenido se somete a preparaciones adicionales, usando un kit de aislamiento de ADN comercial de acuerdo con el protocolo proporcionado por el procedimiento del fabricante. El procedimiento da como resultado la obtención del ADN listo para etapas adicionales del análisis, por ejemplo, realizando una reacción de PCR para detectar bacterias.

25

Ejemplo 3.

Aislamiento de ADN fúngico de sangre:

1. agregar 1,5 ml de sangre completa a 6 ml de cloruro de amonio 0,17 M,

2. incubar las muestras durante 20 minutos a 37 °C,

30 3. centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm,

4. eliminar el sobrenadante,

5. transferir las muestras a tubos con perlas de vidrio (700-1100 µm) y someter a alteración mecánica durante 20 segundos a una velocidad de 4,0 m/s,

6. agregar 200 µl de NaOH 50 mM,

35 7. incubar las muestras durante 10 minutos a 95 °C,

8. centrifugar durante 10 minutos a 12.000 rpm,

9. eliminar el sobrenadante,

10. Agregar 500 µl de regulador que consiste en Tris HCl 50 mM, EDTA 10 mM, β-mercaptoetanol 28 mM (pH= 7,5) y liticasa (5 µl de solución de reserva: 4.000U),

40 11. incubar las muestras durante 30 minutos a 37 °C,

12. centrifugar durante 10 minutos a 12.000 rpm.

El precipitado obtenido se somete a preparaciones adicionales, usando un kit de aislamiento de ADN comercial de acuerdo con el protocolo proporcionado por el procedimiento del fabricante. El procedimiento da como resultado la obtención del ADN listo para etapas adicionales del análisis, por ejemplo, realizar una reacción de PCR para detectar hongos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para el aislamiento simultáneo de ADN microbiano de la sangre, usando lisis enzimática, mecánica y térmica que permite obtener ADN de todos los tipos de organismos en una sonda de muestra, independientemente de la estructura de las células, en el que:
- 5 a) la muestra de sangre completa se agrega a una solución acuosa de cloruro de amonio a una concentración de 0,10-0,25 M, en una proporción de 1:3 a 1:6 al volumen de la muestra de sangre, la muestra se incuba a una temperatura de 35 °C a 40 °C, durante 15 a 30 minutos, luego se somete a centrifugación y se elimina el sobrenadante;
- 10 b) el precipitado obtenido en la etapa (a) se suspende en una solución de lisozima (a una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml) y lisostafina (a una concentración de 0,2 mg/ml a 0,5 mg/ml) en regulador PBS, la suspensión se agita en vórtice o se agita y se elimina el sobrenadante;
- c) el material obtenido en la etapa (b) se somete a desintegración mecánica;
- d) el material se incuba a una temperatura de 35 °C a 39 °C, desde 20 a 50 minutos; después de esto
- 15 e) se agrega una solución de NaOH o KOH (a una concentración de 0,65 mM a 0,8 mM), en una proporción de 1:1 a 1:3 en relación con el volumen del material de la etapa (c); el material se incuba a una temperatura de 80 °C a 95 °C, durante 5 a 10 minutos; la suspensión se centrifuga y el sobrenadante se elimina; se agrega un regulador que tiene un pH de aproximadamente 7,5, que contiene Tris-HCL, EDTA y β-mercaptoetanol, y liticasa con la actividad enzimática de 30 U a 50 U; la muestra se incuba a una temperatura de 35 °C a 39 °C, desde 20 a 50 minutos;
- f) una suspensión se centrifuga y el sobrenadante se elimina;
- g) el ADN microbiano se aísla del precipitado obtenido en la etapa (f).
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (c) se lleva a cabo con el uso de perlas de vidrio.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (e) se lleva a cabo con un regulador que consiste en Tris HCl 50 mM, EDTA 10 mM, β-mercaptoetanol 28 mM.

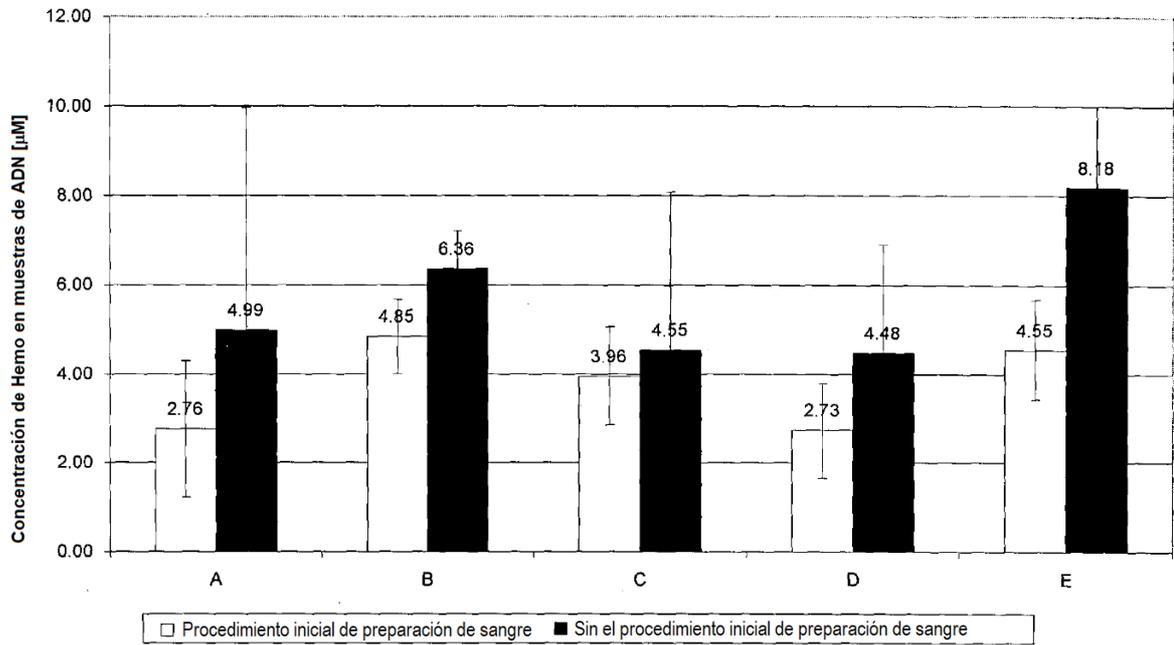


Fig. 1

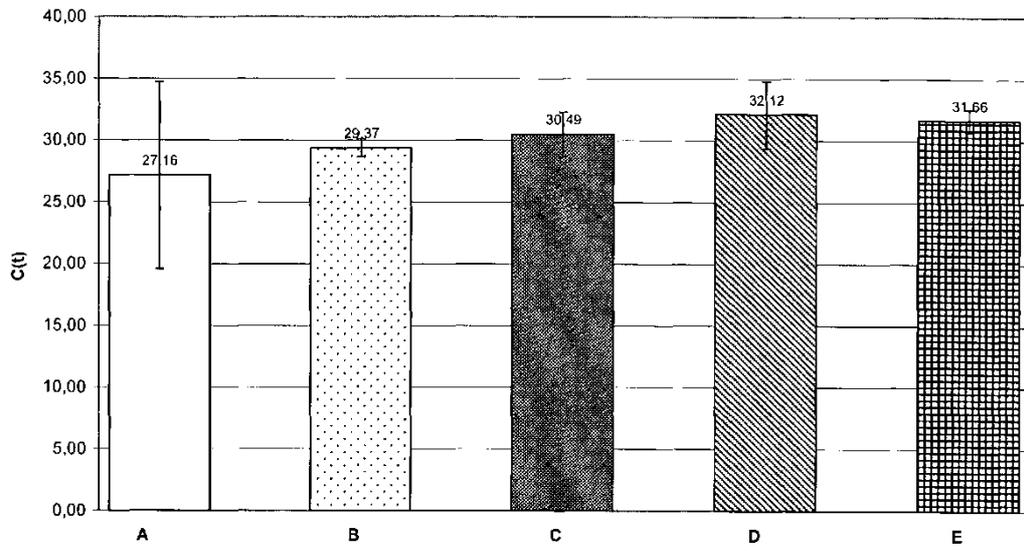


Fig. 2

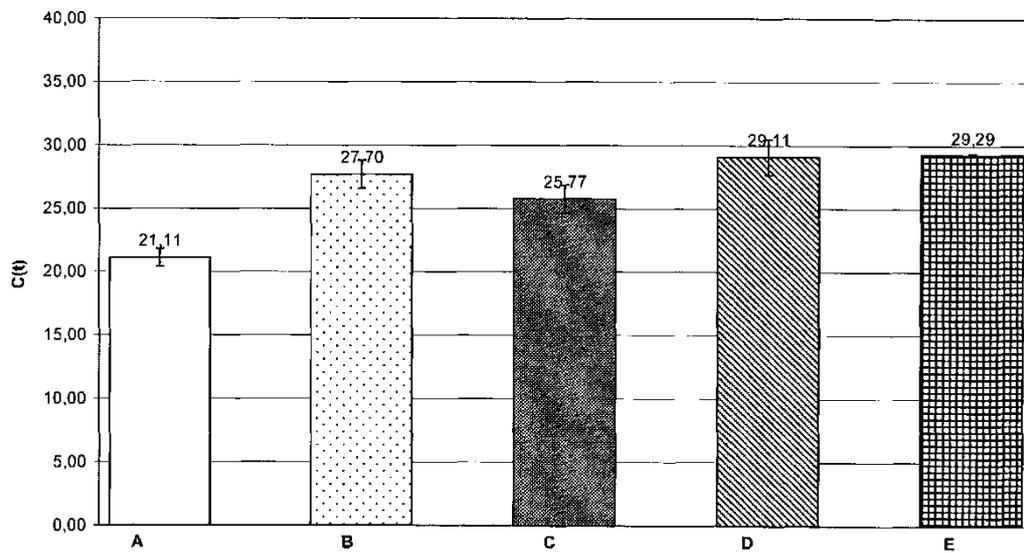


Fig. 3

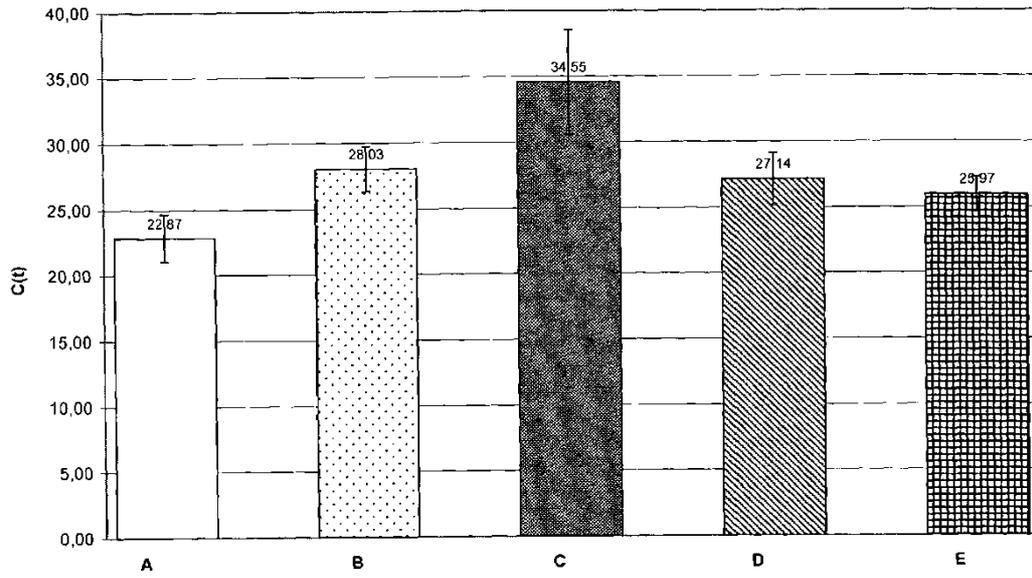


Fig. 4

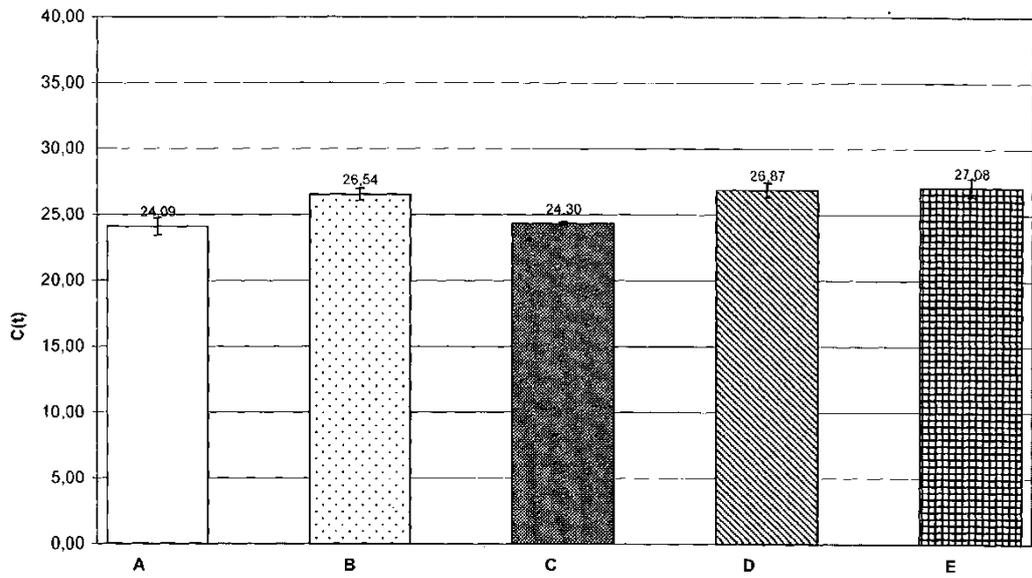


Fig. 5