

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 562**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2011 PCT/NL2011/050563**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO13025095**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2011 E 11763787 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2742359**

54 Título: **Nuevo método y kit para la predicción de éxito de la fecundación in vitro**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2018

73 Titular/es:
**ARTPRED B.V. (100.0%)
Seringenstraat 15
5213 GS 's-Hertogenbosch, NL**

72 Inventor/es:
**KOK, DIRK JAN;
LAVEN, JOZEF STEPHANUS ELISABETH;
MAGHDID, DELSHAD MAMA y
BECKERS, NICOLE GEERTJE MARIA**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 669 562 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

Nuevo método y kit para la predicción de éxito de la fecundación *in vitro*

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere al campo de la reproducción humana, más particularmente a situaciones en las que la reproducción humana está fallando. En un caso tal, se aplican métodos artificiales para ayudar a las mujeres a quedarse embarazadas, pero el éxito de estos tratamientos es bajo y, lo que es más importante, impredecible. La presente invención proporciona ahora un método más fiable para predecir las probabilidades de éxito en la fecundación *in vitro*.

ANTECEDENTES

10 La sub-fecundidad afecta del 10 al 15 % de las parejas en el mundo occidental. Esta sub-fecundidad puede en la mitad de los casos atribuirse a causas femeninas, en el 20-26 % a causas masculinas y en el 25-30 % la causa es desconocida (Evers, J.L., 2002, Lancet 360:151-159). Muchas parejas recurren a la fecundación *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para cumplir su deseo de tener hijos. La tasa de éxito de estas técnicas es aproximadamente del 25 % por ciclo empezado (Andersen, A. et al. 2007, Hum. Reprod. 22:1513-1525). Sería de gran beneficio emocional y económico si esta tasa de éxito pudiera mejorarse. En vista de la carga personal y social de los tratamientos de embarazos asistidos, se desea identificar parejas con una probabilidad muy baja de éxito y parejas con una alta probabilidad de embarazo espontáneo. Especialmente parejas donde la causa de esterilidad es desconocida, mostrar una alta tasa de embarazo espontáneo y tratamiento expectante podría ser deseable para ellas (Brandes, M. et al., 2011, Hum. Reprod. 26:360-368). Así, tanto para mejorar los tratamientos como para decidir en casos individuales si continuar o no, existe una necesidad de modelos que puedan predecir con exactitud si una mujer se quedará embarazada y dará a luz después de FIV/ICSI. Durante más de una década, han estado disponibles modelos que predicen la probabilidad de partos basándose en datos clínicos que incluyen edad, número de intentos de FIV fallidos previos y probable motivo de la esterilidad (Templeton, W. et al., 1996, Lancet 348:1402-1406). Para grandes grupos, la relación de partos predichos frente a observados fue del 40-60 % (Nelson, S.M. y Lawlor D.A. 2011, PLOS Medicine 8:1-10). Estos autores desarrollaron un modelo mejorado basándose en los datos de más de 140.000 mujeres, usando más estratificación en la edad y causas de esterilidad, el procedimiento (a ser) usado, fuente del óvulo y duración del deseo de tener hijos. Cuando el área bajo la curva para la curva de rendimiento diagnóstico (AUROC) del nuevo modelo se usa para cómo de bien funciona este nuevo modelo, se informó de un ligero aumento pero significativo (de 0,6184 a 0,6335). Este modelo parece dar una buena predicción sobre grupos de mujeres más grandes (superiores a 10.000). Sin embargo, no se sabe todavía cómo de bien predice este modelo en un individuo.

Selman et al., (J. Assisted Reproduction and Genetics 24: 395-399 (2007)) desvelan la detección de *Lactobacillus* y *Staphylococcus* en relación con el desenlace de FIV/embarazo.

35 La vía para un parto puede reducirse a tres etapas críticas, fecundación del óvulo, aceptación del óvulo fecundado por el entorno femenino y además desarrollo hasta el parto real. Cuando la primera etapa está teniendo lugar artificialmente (como en FIV e ICSI), la probabilidad de alcanzar un parto puede describirse por marcadores para la segunda etapa. Sin embargo, los factores que son responsables de la aceptación del óvulo fecundado son prácticamente desconocidos. Así, actualmente es imposible establecer criterios que predigan el éxito en esta segunda etapa.

40 Por tanto, todavía existe una necesidad de un modelo que pueda predecir de forma más fiable la probabilidad de un tratamiento de FIV/ICSI satisfactorio en un individuo.

SUMARIO DE LA INVENCION

45 Los inventores han encontrado ahora que puede desarrollarse un modelo que aumenta la predictibilidad de la probabilidad de un tratamiento de FIV/ICSI satisfactorio (o insatisfactorio) en un individuo al 75-100 %. Esto ha conducido a la formulación de un método y kit para la predicción de la probabilidad de un embarazo satisfactorio según las reivindicaciones adjuntas 1-13, que define el alcance de la presente invención. La descripción proporciona un método de predicción de la probabilidad de un embarazo satisfactorio en un sujeto que comprende las etapas de:

- a. Tomar una muestra de orina;
- 50 b. Determinar la cantidad de las especies de bacterias *Lactobacillus* y *Staphylococcus* como un porcentaje de la cantidad total de bacterias presentes en dicha muestra; y
- c. Predecir la probabilidad de un embarazo satisfactorio basándose en la relación entre dichas bacterias.

Preferentemente, en dicho método el sujeto está sometido a o es elegible para un método de inseminación artificial, tal como FIV o ICSI. En otra realización preferida, la especie de *Lactobacillus* es *Lactobacillus crispatus* y la especie de *Staphylococcus* es *Staphylococcus aureus*.

Más preferido, la medición de la cantidad de bacterias se realiza por PCR, más preferentemente qPCR, en cuyo método *Staphylococcus* se determina entonces preferentemente usando los cebadores 5'-GAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGAC-3' y 5'-GCATCGTTGCCTTGGTAAGC-3' y *Lactobacillus* se determina preferentemente usando los cebadores 5'-GATTTACTTCGGTAATGACGTTAGGA-3' y 5'-AGCTGATCATGCGATCTGCTTTC-3'.

Alternativamente, la medición de la cantidad de bacterias se realiza por espectrometría de masas, más preferentemente espectrometría de masas por MALDI-TOF

Más específicamente en el método según la invención, la probabilidad de un embarazo satisfactorio se determina por la fórmula:

$$Y = a * (\% \text{ de } Lactobacillus) - b * (\% \text{ de } Staphylococcus) - c$$

en la que

a tiene un valor de 0,025 a 0,051;

b tiene un valor de 0,04 a 0,07;

c tiene un valor de -1,10 a -0,66;

% de *Lactobacillus* es la cantidad de bacterias *Lactobacillus* expresada como el porcentaje de la cantidad total de bacterias;

% de *Staphylococcus* es la cantidad de bacterias *Staphylococcus* expresada como el porcentaje de la cantidad total de bacterias;

y en la que Y representa la probabilidad de éxito.

Preferentemente en esta fórmula, a tiene un valor de 0,025 a 0,04, también preferentemente b tiene un valor de 0,04 a 0,06, y adicionalmente preferentemente c tiene un valor de -1,06 a -0,9, más preferentemente de -1,06 a -1,01.

Las muestras en las que las bacterias se detectan pueden ser muestras de orina, y preferentemente las bacterias se detectan en una muestra de orina del chorro medio, pero las muestras también puede ser muestras vaginales, tales como un exudado vaginal.

La descripción también proporciona un kit para la predicción de la probabilidad de un embarazo satisfactorio, que comprende:

a. Medios para medir el contenido total de bacterias en una muestra de un sujeto;

b. Medios para medir el contenido de bacterias de *Lactobacillus*;

c. Medios para medir el contenido de bacterias de *Staphylococcus*;

d. Medios para calcular la probabilidad según la fórmula definida anteriormente.

Preferentemente, en un kit tal los medios para medir el contenido de bacterias de *Lactobacillus* comprenden los cebadores 5'-GATTTACTTCGGTAATGACGTTAGGA-3' y 5'-AGCTGATCATGCGATCTGCTTTC-3', mientras que los medios para medir el contenido de bacterias de *Staphylococcus* comprenden los cebadores 5'-GAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGAC-3' y 5'-GCATCGTTGCCTTGGTAAGC-3'. También preferido en un kit tal, los medios para medir el contenido total de bacterias en una muestra de un sujeto comprenden un conjunto de cebadores general específico para ADNr 16s bacteriano, más preferentemente dicho conjunto de cebadores general comprende al menos un cebador EUB directo y al menos uno inverso.

Más preferido en dicho kit, los medios para calcular la probabilidad comprenden un procesador que es capaz de recibir los valores bacterianos medidos como entrada, y que calcula la probabilidad según la fórmula que se ha definido anteriormente, y preferentemente el procesador es capaz de dar como resultado la probabilidad a un medio de señalización que puede ser leído por la persona que usa el kit.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la siguiente descripción y ejemplos se usan varios términos. Con el fin de proporcionar un entendimiento claro y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, que incluyen el alcance a ser dado a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones. A menos que se defina de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

'FIV' o fecundación *in vitro* es un procedimiento en el que se extraen los óvulos del ovario de una mujer. Son fecundados con espermatozoides de un procedimiento de laboratorio, y entonces el óvulo fecundado (embrión) se devuelve al útero de la mujer.

5 'ICSI' representa inyección intracitoplásmica de espermatozoides, un procedimiento de fecundación en tubo de ensayo en el que se inyecta un espermatozoide directamente en un óvulo para lograr la fecundación. ICSI se hace principalmente para esterilidad masculina y puede formar parte de un procedimiento de FIV.

'Orina del chorro medio' se define en el presente documento como un espécimen de orina recogido durante la mitad de un flujo de orina, después de que la abertura urinaria se haya limpiado cuidadosamente (por la orina que ha pasado). Una muestra de orina del chorro medio también se llama un 'especimen limpio'.

10 Una 'infección urinaria' (IVU) es una infección bacteriana que afecta cualquier parte de las vías urinarias. Síntomas incluyen sensación frecuente y/o necesidad de orinar, dolor durante la micción y orina turbia.

15 'ADNr 16S' es el ADN en los nucléolos de los núcleos celulares que codifican un tipo de ARN que posteriormente forma el componente de ribosomas en el que se lleva a cabo la traducción de ARN mensajero en cadenas de proteína. Se ha usado la comparación de secuencias de genes del ARN ribosómico de diferentes organismos para determinar relaciones evolutivas entre los organismos.

20 Los inventores han encontrado ahora que uno de los factores que predice el éxito de la implantación del óvulo fecundado en el útero está formado por la constitución de la población bacteriana en el área urogenital de la mujer. Se sabe que la composición de poblaciones bacterianas (como en el intestino o en la vagina) son una reflexión de su entorno directo y que esta composición pueden cambiar tras cambios en ese entorno. Esto es, por ejemplo, evidente en el hallazgo de que a través de todos los grupos de población humana las bacterias residentes en el intestino no son un conjunto al azar de la variedad de especies bacterianas que los presentes inventores encuentran. Son poblaciones distintas que están en equilibrio dinámico con el entorno proporcionado por su hospedador (Blaser, M.J. y Falkow, S., 2009, Nature Rev. Microbiol. 7:887-894). Los intestinos humanos alojan bacterias que son aceptadas, ya que confieren capacidades de las que carecen las células intestinales humanas y que responden a la dieta de su hospedador (De Filippo, C. et al., 2010, PNAS 107:14691-14696). Un cambio en la dieta es de hecho un cambio en la composición química del entorno en el que las bacterias viven. Otros factores ambientales que influirán en la composición de la microbiota intestinal incluyen factores del hospedador como sistemas de defensa (inmunitarios), características de la superficie celular y las características físicas del nicho donde residen (Bäckhed, F. et al., 2005, Science 307:1915-1920).

30 Un ejemplo del aparato genitourinario es el cambio en la población bacteriana vaginal que se produce cuando cambian las condiciones vaginales. Normalmente, la vagina proporciona un entorno de pH bajo que favorece una población compuesta de 1 a 6 especies bacterianas y dominada por especies de *Lactobacillus* (Fredricks, D.N. et al., 2005, New Eng. J. Med., 353:1899-1911). Los *Lactobacilli* mantienen además el pH bajo y además defienden activamente su nicho contra otras bacterias. En mujeres con vaginosis bacteriana, el pH es más alto, la población bacteriana vaginal se amplía a hasta 17 especies y la presencia de *Lactobacilli* se reduce enormemente en favor de las bacterias patógenas. El comienzo de este desplazamiento en la composición de la población bacteriana puede ser cualquiera de una disminución en las especies de *Lactobacillus* o una invasión de otras bacterias. Lo siguiente, sin embargo, será un equilibrio de desplazamiento entre una disminución en las especies de *Lactobacillus*, aumento en el pH y aumento en especies como *Staphylococcus* que progresan a la nueva situación. Queda por establecer si estos desplazamientos preceden a síntomas de vaginosis.

La indicación de que pueden usarse poblaciones bacterianas de predicción de situaciones específicas se encontró en un pequeño estudio en hombres con y sin uretritis donde se investigaron poblaciones bacterianas con análisis de ADNr 16S de amplio espectro (Riemersma, W.A. et al., 2003, J. Clin. Microbiol. 41:1977-1986). La presencia de tres bacterias hasta ahora desconocidas se asoció a la ausencia de uretritis.

45 En la investigación que generó la presente invención, los inventores hicieron básicamente dos preguntas: ¿Contiene información la población bacteriana de la orina en una mujer si el entorno interno de esa mujer es adecuado para FIV o ICSI para lograr el embarazo y está la población bacteriana relacionada con un riesgo cambiado de infección urinaria? La idea tras este primer objetivo es que la primera etapa hacia el éxito de FIV o ICSI es la aceptación de un cuerpo extraño, el óvulo fecundado, por el entorno interno de la mujer durante el periodo en que debe anidar el óvulo. Este entorno interno estará bajo regulación hormonal. La naturaleza de esta regulación no es completamente conocida, pero es probable que no sólo afecte las condiciones en el útero, sino también las condiciones en cualquier parte en el cuerpo como las vías urinarias. Así, afectará la aceptación de cuerpos extraños, la población bacteriana residente, en esas vías urinarias. Basándose en esta idea se formularon dos hipótesis que condujeron a la investigación: primero que las poblaciones bacterianas en las mujeres indican cómo de bien será aceptado un óvulo fecundado y segundo que las poblaciones bacterianas en la orina reaccionarán con los cambios ambientales que se producen en una mujer cuando se queda embarazada. Durante el embarazo, las vías urinarias experimentan cambios anatómicos como dilatación en la pelvis renal y uretra, desplazamiento de la vejiga y estasis urinaria relacionada con la relajación del músculo liso de la vejiga y cambios químicos (pH de la orina, osmolalidad de la orina, glicosuria y aminociduria). Puede esperarse que estas condiciones cambiadas sean más acogedoras para los

tipos bacterianos distintos de las bacterias residentes. Como las bacterias residentes también pueden ser una fuente de problemas dentro de las propias vías urinarias (infección), en el estudio también se investigó la relación entre la composición de la población bacteriana en la orina y la infección urinaria.

5 En este estudio pareció que se encontró un grupo central de cinco especies/cepas bacterianas bajo todas las circunstancias probadas (embarazadas, no embarazadas, no embarazadas después de FIV/ICSI). *Lactobacillus crispatus* y *Staphylococcus aureus* estuvieron presentes en la mayoría de todas las muestras, mientras que *E. coli*, *Streptomyces sp.* y la cepa aislada de bacterias sin cultivar CH96Fc_H10 se encontraron en un número más pequeño de muestras. En todas las mujeres, más del 70 % de la población total consistió en 4 tipos máximos que estaban individualmente presentes como más del 10 % de la población total. Esto incluyó las cinco especies bacterianas mencionadas más una lista corta de otros tipos (véase la Tabla 5). Se encontró una lista larga de los tipos bacterianos en pequeños porcentajes en uno o algún número de muestras (véase la Tabla 3).

15 El grupo central de 5 especies bacterianas que se encontró en las mujeres en todas las condiciones de prueba de los presentes inventores puede representar especies que tienen una alta probabilidad de invadir las vías urinarias desde un conjunto externo, que se adaptan mejor a las condiciones en las vías urinarias o que son mejor aceptadas por el hospedador. El segundo grupo consiste en especies que se encuentran poco frecuentemente, pero que pueden persistir con el tiempo en mujeres individuales, incluso llegar a ser las especies dominantes. Motivos por los que estas especies no se encuentran más frecuentemente pueden ser que la exposición de las vías urinarias a los conjuntos externos para estas bacterias no es la misma para todas las mujeres, o que los factores del hospedador específicos permiten su presencia solo en un pequeño subconjunto de mujeres. El gran número de especies que se encontró solo en una única muestra puede representar viandantes que no sobreviven bien en las vías urinarias.

20 Lo que puede concluirse del estudio es que cuando una mujer se queda embarazada, la composición de la población bacteriana en las vías urinarias cambia espectacularmente. Antes del embarazo, la población bacteriana está dominada por diversas cepas de *Lactobacillus* (principalmente *L. crispatus*). Durante el embarazo, *Lactobacillus* es sustituido por otras bacterias, principalmente *Staphylococcus aureus*, que frecuentemente llegan a ser las especies dominantes. Este desplazamiento no fue debido al procedimiento que recibieron las mujeres, ya que no se produjo en mujeres que se sometieron a FIV/ICSI pero no se quedaron embarazadas.

25 Por supuesto, el hallazgo de que la población de las vías urinarias refleja si una mujer está embarazada o no es clínicamente irrelevante, ya que hay formas más fáciles de determinar el embarazo. La relevancia viene dada por la observación de que aparentemente el estado de fecundidad de la mujer influye en la población bacteriana en las vías urinarias. Esto respalda la hipótesis de que la población bacteriana en las vías urinarias es un marcador de las condiciones internas del hospedador.

30 El estudio muestra que esta función de marcador es suficientemente específica para diagnosticar la fecundidad de una mujer que quiere quedarse embarazada. Como es evidente de la sección experimental, un modelo construido en la presencia relativa de especies de *Lactobacillus* y especies de *Staphylococcus* en la orina antes del procedimiento de FIV/ICSI puede predecir si FIV/ICSI será satisfactoria o no.

35 Por consiguiente, la descripción proporciona un método de predicción de la probabilidad de un embarazo satisfactorio en un sujeto que comprende las etapas de:

- a. Tomar una muestra de orina;
- 40 **b.** Determinar la cantidad de las especies de bacterias *Lactobacillus* y *Staphylococcus* como un porcentaje de la cantidad total de bacterias presentes en dicha muestra; y
- c.** Predecir la probabilidad de un embarazo satisfactorio basándose en la relación entre dichas bacterias.

45 Un método tal, aunque preferido para sujetos que están sometiéndose a o elegibles para un método de inseminación artificial, como FIV o ICSI, no está limitado a un grado tal. El método también puede ser útil para sujetos que están interesados en cómo serían sus probabilidades de quedarse embarazadas de una forma natural. A este respecto, es sorprendente que cuando se toman muestras de sujetos masculinos, de mujeres jóvenes o de mujeres que ya están embarazadas, es decir, sujetos que no pueden quedarse embarazadas, el método también es capaz de dar una predicción correcta: de estas muestras resultó que el desenlace de la prueba era negativo. Por supuesto, en casos en los que no se usa inseminación artificial, la probabilidad de un embarazo satisfactorio calculado como antes está solo relacionado con aquellas situaciones en las que la probabilidad de quedarse embarazada no está influida por la esterilidad de la pareja o por una pronunciada insuficiencia fisiológica en el sujeto femenino (por ejemplo, la ausencia de útero, desequilibrios hormonales, etc.).

50 Preferentemente, la especie de *Lactobacillus* que va a detectarse es *Lactobacillus crispatus*. Sin embargo, también puede ser útil detectar también otras especies de *Lactobacillus*, tales como *L. jensenii*, *L. iners* y *L. gasseri*. Estas especies se encontraron en algunas de las mujeres y la inclusión de estas especies en el grupo de *Lactobacillaceae* aumenta la potencia predictiva del método anterior. Lo mismo es cierto para *Staphylococcus*, donde no solo se encontró *Staphylococcus aureus*, sino también *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii* y se halló que añadían potencia predictiva. Preferentemente, la detección de las especies bacterianas en el método de la invención tiene

lugar mediante ensayos biológicos moleculares, tales como PCR y preferentemente qPCR. En un ensayo tal, las bacterias se detectan y cuantifican por amplificación con cebadores que son específicos para las bacterias que van a detectarse. En el caso de *Lactobacillus* esto significa que pueden usarse cebadores específicos para *L. crispatus*, pero que preferentemente tales cebadores también reconocerían otras especies de *Lactobacillus*, como se ha mencionado anteriormente. Actualmente, un método de detección óptimo comprende los cebadores específicos de *Lactobacillus* que se usan en el Ejemplo 2.

Un método similar de operación también se aplica a la detección de especies de *Staphylococcus*, donde debe detectarse predominantemente *S. aureus*, pero donde también puede estar englobada la detección de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii*. También en este caso, el conjunto de cebadores como se muestra en el Ejemplo 2 da resultados óptimos.

Debe, sin embargo, entenderse que esto no es la relación absoluta de *Lactobacillus* y *Staphylococcus* detectados que debe usarse. Más bien, se usa la relación de los porcentajes de estas bacterias con respecto al contenido total de bacterias. Con el fin de determinar el contenido total de bacterias en la muestra, se prefiere usar cebadores que reconocen el ADNr 16S bacteriano que abre la oportunidad de usar cebadores que reconocen partes conservadas del ADNr 16S que está presente en todas las bacterias. Se han descrito en la bibliografía conjuntos de cebadores que son específicos para el ADNr 16S bacteriano y, por tanto, capaces de reconocer solo bacterias en una muestra en la que está presente material biológico de otros organismos, se han descrito en la bibliografía. En Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/16S_ribosomal_RNA) se describen los siguientes cebadores:

Nombre de cebador	Secuencia (5'-3')
B27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
U1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
928F	TAA AAC TYA AAK GAA TTG ACG GG
336R	ACT GCT GCS YCC CGT AGG AGT CT
1100F	YAA CGA GCG CAA CCC
1100R	GGG TTG CGC TCG TTG
337F	GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG
907R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT
785F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA
805R	GAC TAC CAG GGT ATC TAA TC
533F	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A
518R	GTA TTA CCG CGG CTG CTG G

Un conjunto de cebadores muy adecuado usa los llamados cebadores EUB, de los que están disponibles varios (por ejemplo, EUB f933 y EUB r1387; EUB 8f y EUB 536r, EUB 341 y EUB 534, etc.). También están comercialmente disponibles kits para detectar ADNr 16S bacteriano basándose en cebadores EUR (tales como el kit Onar®EUB de Iris Technologies Int., Cursdorf, Alemania).

En otra realización de la invención, las cantidades de bacterias en la muestra se determinan por medios espectrográficos, tales como espectrografía de masas, espectrografía Raman, y similares. Preferentemente, en una medición de la cantidad tal se usa MALDI-TOF como herramienta analítica.

Cuando se determinan las cantidades de bacterias totales y las cantidades de *Lactobacillus* y *Staphylococcus*, la relación de las bacterias, y así la probabilidad de un embarazo satisfactorio, puede calcularse según la fórmula:

$$Y = a * (\% \text{ de } Lactobacillus) - b * (\% \text{ de } Staphylococcus) - c$$

en la que

a tiene un valor de 0,025 a 0,051;

b tiene un valor de 0,04 a 0,07;

c tiene un valor de -1,10 a -0,66;

ES 2 669 562 T3

% de *Lactobacillus* es la cantidad de bacterias *Lactobacillus* expresada como el porcentaje de la cantidad total de bacterias;

% de *Staphylococcus* es la cantidad de bacterias *Staphylococcus* expresada como el porcentaje de la cantidad total de bacterias;

- 5 y en la que Y representa la probabilidad de éxito. El valor de Y puede convertirse en una probabilidad que oscila entre 0 (sin probabilidad de éxito) y 1 (éxito seguro) por la fórmula:

$$\text{Probabilidad} = e^Y / (1 + e^Y)$$

10 Dependiendo de las constantes que se usan, el valor de Y variará entre 4,44 (100 % de *Lactobacillus*, a=0,051 y c=-0,66) y -8,1 (100 % de *Staphylococcus*, b=0,07 y c=-1,1). Para la comparación de embarazo predicho frente a embarazo real, se encontró que el mejor valor de corte era la probabilidad = 0,5. Un valor de Y igual o superior a 0,5 predice entonces el éxito y un valor inferior a 0,5 predice el fracaso. Con este valor de corte, la fórmula predice correctamente el embarazo después del primer intento de FIV/ICSI en el 86 % de las mujeres y predice correctamente el embarazo después de múltiples intentos durante 1 año en el 92,3 % de las mujeres. Así, en el 7,7 % de los casos, la fórmula predijo el fracaso, aunque las mujeres se quedaron embarazadas después de FIV/ICSI (negativo falso). En el 3,8 %, el embarazo no se completó debido a un aborto natural. En el 3,8 %, la fórmula no acertó en el parto real. En el 25 % de los casos en los que la fórmula predijo el embarazo, no se logró embarazo en curso (positivo falso).

20 Como las mujeres que quieren quedarse embarazadas y usan una prueba predictiva para decidir si proceden o no con FIV/ICSI no aceptarán especialmente una predicción de negativo falso, se desea reducir las predicciones de negativos falsos del 3,8 % al cero. En ese caso, el valor de corte debe ser reducido a 0,04. Sin embargo, en este valor de corte la fórmula predice el embarazo para todas las mujeres, que por supuesto también es no deseado.

Para la mejor predicción de embarazo completado se usa una fórmula donde a tiene un valor de 0,03 a 0,051, mientras que adicionalmente preferentemente b tiene un valor de 0,056 a 0,064. Más preferido, c tiene un valor de -1,06 a -1,03. El corte para la probabilidad para obtener el embarazo es entonces preferentemente 0,5.

25 Una muestra de un sujeto es preferentemente una muestra de orina, más preferentemente una muestra de orina del chorro medio. Se prefiere una muestra de orina del chorro medio tal, ya que esto representa mejor la población bacteriana en la orina. Esto es debido a que la primera orina está enjuagando la uretra y traería consigo bacterias que pueblan la uretra.

30 También es posible realizar el método de la invención en una muestra vaginal. Como los mismos tipos de bacterias son encontrados en la vagina, es plausible que pueda usarse una relación similar y preferentemente una fórmula similar de predicción de la probabilidad de un embarazo satisfactorio en lo que respecta a muestras de orina. Es posible que los valores de a, b y c necesiten ser optimizados, pero tal optimización está perfectamente dentro de la experiencia del experto.

35 También se describe en el presente documento un kit para determinar la probabilidad de un embarazo satisfactorio. Un kit tal comprendería medios para determinar el contenido total de bacterias en la muestra y medios para detectar tanto las bacterias de *Lactobacillus* como de *Staphylococcus*. Además, un kit tal comprendería medios para calcular la probabilidad basándose en la fórmula como se representó anteriormente.

40 Tales medios para calcular la probabilidad comprenderían un procesador que es capaz de recibir los valores de la detección del contenido total de bacterias y los géneros/especies anteriormente mencionados específicos de bacterias. El procesador calculará entonces Y según la fórmula como se describe en el presente documento y dará como resultado la probabilidad de un embarazo satisfactorio. Este resultado puede estar en forma de un valor numérico (el valor real de Y resultante de la fórmula), pero también puede ser una indicación de la probabilidad, por ejemplo mediante una fuente de luz de señalización, que será o bien roja (negativa) o bien verde (probabilidad positiva), o mediante una barra de color codificado, que representa el valor numérico de Y, donde los valores negativos muestran un gradiente de rojo oscuro (fuertemente negativo) pasando por rojo claro (negativo medio) a amarillo (aproximadamente cero) y los valores positivos muestran un gradiente de amarillo (aproximadamente cero) pasando por verde claro (positivo medio) a verde oscuro (fuertemente positivo). De una forma tal, el sujeto puede recibir una indicación visual de la fiabilidad de la predicción. En todas las aplicaciones, puede incluirse una opción donde el valor de corte para la probabilidad, que está fijada habitualmente a 0,5, se reduce para reducir el número de predicciones negativas falsas a costa de aumentar el número de predicciones positivas falsas. Por supuesto, serían posibles otras indicaciones que representan el valor de Y, y el experto será capaz de designar variantes en las realizaciones anteriores.

EJEMPLO

Inclusión de pacientes y asignación de grupos

En 2005 y 2006, 98 mujeres que visitaron el departamento de FIV del ErasmusMC en Rotterdam se enrolaron en el estudio. De estas 98 mujeres, 40 (41 %) se quedaron embarazadas durante el estudio de 3 años después de en algunos casos múltiples intentos. Después de dar consentimiento informado e indicaciones sobre cómo realizar una recogida de orina del chorro medio, las mujeres proporcionaron una muestra de orina del chorro medio durante la 1ª visita y respondieron a preguntas sobre el uso previo de antibióticos e IVU previas. Recibieron un frasco de orina y una carpeta que describía el procedimiento de recogida de orina del chorro medio. Se les recordó a las mujeres que recogieran las 2ª muestra cuando estuvieran o bien en su 16ª semana de embarazo o en un tiempo comparable después de la implantación del embrión para aquellas mujeres que no se habían quedado embarazadas. La muestra de orina se devolvió al hospital el mismo día o se congeló y se devolvió en una fecha posterior. Después de la recogida de la 2ª muestra, las mujeres fueron seguidas durante un máximo de tres años para recoger datos sobre el desenlace del embarazo y en posteriores embarazos.

De las 98 mujeres, 16 no respondieron a todas las preguntas en el cuestionario o no devolvieron una segunda muestra de orina intacta. Éstas se excluyeron del estudio de descubrimiento de los presentes inventores que requiere muestras en dos momentos de tiempo. De las 82 mujeres restantes, se incluyeron las primeras 21 que se quedaron embarazadas por el primer ciclo de FIV/ ICSI que siguieron la 1ª muestra de orina para el estudio de descubrimiento. Se incluyeron veintiuna mujeres que no estaban embarazadas cuando se recogió su 2ª muestra (16 semanas después de la implantación del embrión) en el grupo de mujeres no embarazadas. Después de la ronda de inclusión se encontró que una de las 21 mujeres no embarazadas estaba embarazada cuando recogió su 2ª muestra. Se reasignó al grupo de embarazadas. Esto produjo un grupo de embarazadas de n=22 y un grupo de no embarazadas de n=20. En estas 42 mujeres los presentes inventores determinaron la población bacteriana en ambas muestras de orina por análisis de ADNr 16S de amplio espectro. Además, las mujeres fueron clínicamente seguidas durante tres años con respecto a embarazos y desenlaces de los mismos. Las especies bacterianas identificadas en la 1ª muestra de orina de las 42 mujeres se usaron para construir un modelo que predice el desenlace de FIV/ICSI (embarazadas/ no embarazadas). Se compararon los cambios en la población bacteriana que ocurrieron cuando las mujeres se quedaron embarazadas con cambios en las principales causas de IVU. Los últimos se obtuvieron de un grupo separado (véase más adelante).

De las 40 mujeres restantes que devolvieron las dos muestras de orina y un cuestionario completo más mujeres que devolvieron tanto una primera muestra intacta como un cuestionario completo, los presentes inventores compusieron un grupo de validación independiente, n=42. En este grupo, los presentes inventores validaron el modelo predictivo obtenido anteriormente usando una prueba de qPCR que se basó en cebadores específicos para las bacterias que están incluidas en el modelo predictivo.

Obsérvese que debido al protocolo de selección de los presentes inventores, la tasa de éxito de embarazos en la fase de descubrimiento de los presentes inventores fue de $22/42 = 52\%$ en comparación con el 41 % para el grupo entero de 98 mujeres.

Las características de los grupos se muestran en la Tabla 1.

Criterios de exclusión

Se excluyeron mujeres que usaron antibióticos o tuvieron una IVU durante el periodo de estudio de 16 semanas.

40 *Datos de seguimiento (periodo de 3 años)*

En 4 mujeres del grupo de embarazadas, el embarazo terminó en aborto natural (3) o muerte intrauterina (IUD). Después de procedimientos adicionales, las 4 tuvieron embarazos satisfactorios en el plazo de 6 meses después de que se recogiera la 2ª muestra.

Del grupo de FIV que fracasó, 12 mujeres nunca se quedaron embarazadas, 7 no estaban embarazadas durante la recogida de la 2ª muestra, pero estuvieron embarazadas en otro momento de tiempo. Éstas fueron:

Paciente 6, embarazada >1 año después de la 1ª muestra, <1 año después de 2ª muestra

Paciente 10, embarazada en el plazo de 1 año después de la 1ª muestra (gemelos)

Paciente 14, embarazada en el plazo de 1 año después de la 1ª muestra

Paciente 19, en el plazo de 1 año después de la 1ª muestra, aborto natural

50 Paciente 58, se encontró que era embarazo espontáneo aproximadamente en el momento de la recogida de la 1ª muestra. Resultó en IUD. Se siguió la FIV y 16 semanas después de la implantación del embrión se recogió la 2ª muestra. Fracasó la FIV. Esta paciente se asignó al grupo de no embarazadas para la prueba de desenlace de la primera FIV/ICSI y la prueba de cambios debidos al embarazo. Para finalizar, la construcción

del modelo también se realizó con la paciente 58 que se asignó al grupo de embarazadas. Se asignó al grupo de embarazadas para la prueba de si una mujer podría quedarse embarazada en el plazo de 1 año.

Paciente 78, embarazo espontáneo > 1 año después de la 1ª y 2ª muestra, aborto natural.

5 Paciente 92, embarazada (FIV) > 1 año después de la 1ª y 2ª muestra, aborto natural, luego embarazo espontáneo satisfactorio 2 años después de la 1ª muestra.

Modelo predictivo de éxito de FIV/ ICSI

10 Se entraron los datos de la población bacteriana de la 1ª muestra de orina en el análisis de regresión binomial para construir dos modelos. El modelo 1 predice si el primer intento de FIV/ICSI logrará el embarazo. El modelo 2 predice si una mujer se quedará embarazada durante 1 año de intentos de FIV/ICSI (1 a 3 intentos). Para este modelo, las pacientes 10, 14 19 y 58 que se quedaron/ estaban embarazadas en el plazo de 1 año después de la recogida de la 1ª muestra de orina, en la que se basa el modelo, se reasignaron al grupo de embarazadas, dando un grupo de embarazadas de n=26 y un grupo de no embarazadas de n=15. Las pacientes 6, 78 y 92 estuvieron en el grupo de no embarazadas en el plazo de 1 año debido a que su embarazo empezó más de 1 año después de la recogida de la segunda muestra. Los modelos predictivos se aplicaron a las muestras de orina recogidas en la semana 16. Los modelos basados en el análisis de amplio intervalo se tradujeron en una prueba de qPCR específica de especie que se validó en el grupo de prueba independiente.

Población bacteriana y causas de IVU en mujeres no embarazadas y embarazadas.

20 Las poblaciones bacterianas encontradas con el análisis de ADN representan bacterias que están presentes en bajos números en las vías urinarias de mujeres embarazadas/ no embarazadas sin IVU. Estos datos se compararon con los datos sobre causas de IVU e infección vaginal en mujeres embarazadas/ non embarazadas obtenidos por cultivos de orina y exudado vaginal de mujeres que asistieron al Hospital de Maternidad en Erbil (región del Kurdistán, Iraq). Durante 2009, en total se obtuvieron 599 resultados de cultivo de orina (210 no embarazadas y 389 embarazadas) y 216 resultados de cultivo de exudado vaginal (94 no embarazadas y 122 embarazadas).

Tabla 1. Características de dos grupos de pacientes

	Embarazadas	No embarazadas
Edad	32,7±3,7	33,6±5,9
IMC	25,0±4,1	22,9±2,7
Fumadora	1	1
Duración del deseo de tejer hijos en años	4,1±3,4	6,0±5,4
Causa		
Masculina	10	7
Masculina / pesa	1	1
Masculina / tuba		1
Cuello uterino		1
Problemas del ciclo	3	1
Desconocida	5	7
Endometriosis		1
después de ovariectomía	1	
Pof	1	
Tuba	1	1

25 **Métodos**

30 **Purificación de ADN.** Se evaluó la composición de la población bacteriana por análisis de ARNr 16S bacteriano de amplio espectro (Riemersma, W.A. et al., 2003, J. Clin. Microbiol. 41:1977-1986). Se centrifugaron muestras de orina a 800 g durante 10 minutos. El sedimento se almacenó a -80 °C hasta uso adicional. Entonces se usaron 150 µl del sedimento para la extracción de ADN y purificación. A muestras con un volumen de < 150 µl, se añadió una cantidad de compensación de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)-EDTA 0,1 mM-tampón de glucosa 50 mM. Primero, se añadieron

75 µl de disolución de lisostafina (10 mg/ml; Sigma, St Louis, Mo.), y la mezcla se calentó a 37 °C durante 30 min. A partir de aquí, se añadió 1 ml de tampón de lisis de guanidinio (isotiocianato de guanidinio 4 mM, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4], EDTA 0,2 M, 0,1 % de Triton X-100), y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h, después de lo cual se añadieron 50 µl de suspensión de Celite. Las muestras se mezclaron a intervalos regulares durante 10 min a temperatura ambiente. Después de agitar con vórtex y centrifugar (10 min a 14.000 rpm en una centrífuga de Eppendorf), el sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó dos veces con un segundo tampón de lisis (isotiocianato de guanidinio 4 M, Tris-HCl 0,1 M; pH 6,4), dos veces con etanol (70 %) y finalmente una vez con acetona. El sedimento se secó a vacío y se emulsionó en 100 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0). La muestra se calentó a 56 °C durante 10 min y se centrifugó (10 min a 14.000 rpm en una centrífuga de Eppendorf). El sobrenadante se usó como molde para PCR en un tampón (pH 7,5) que contenía Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,1 mM y glucosa 50 mM.

PCR. Se realizó aislamiento de ADN_r 16S bacteriano del ADN purificado con una reacción de PCR usando cebadores dirigidos contra la parte conservada del gen, EUB-L (5'-CTTTACGCCCATTTAATCCG-3') y EUB-R (5'-AGAGTTTGATCCTGGTTCAG-3'). La PCR genera un fragmento de ~500 pb que deriva del extremo 3' del gen de ARN_r de subunidad pequeña (sup) (Wilson, K.H. et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28:1942-1946). A 5 µl de la disolución de ADN purificada se añadieron 45 µl de mezcla de PCR (10 µl de disolución madre de trifosfato de desoxinucleótido 20 mM (Amersham Life Science, Cleveland, Ohio), 5 µl de tampón de PCR SuperTaq concentrado 10 veces (HT Biotechnology, Cambridge, Reino Unido), 0,5 µl de ambos cebadores, 28,92 µl de agua destilada y 0,08 µl de polimerasa SuperTaq (15 U/µl; HT Biotechnology, Cambridge, Reino Unido). La reacción de PCR incluyó una etapa de desnaturalización previa al ciclo a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C (45 s), hibridación a 55 °C (45 s) y extensión a 72 °C (45 s). Como muestra de control, se ejecutaron 50 µl de mezcla de PCR sin muestras de ADN adicionales en paralelo. Entonces, se analizaron porciones de 10 µl de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1 % que contenía bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en 0,5X TBE (Tris 50 mM, borato 50 mM, EDTA 1 mM); se tiñeron geles en bromuro de etidio acuoso (10 ng/ml) y se fotografiaron bajo iluminación UV.

Clonación de productos de amplificación. Los productos de amplificación por PCR contienen una mezcla de fragmentos de ADN_r 16S que se originan de las diferentes bacterias que estaban presentes en la orina. Para separar estos fragmentos se hizo una etapa de clonación-transformación. De cada producto de PCR se usaron 3 µl para la ligación en un vector pGEM-T easy y se transformó por choque térmico en células de *Escherichia coli* competentes JM109. Los clones se cultivaron durante la noche a 37 °C en placas de LB agar que contenían ampicilina (100 µg/ml) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido; 40 µg/ml). Los transformantes se identificaron por cribado de colonias azules-blancas.

Secuenciación. De todos los clones que contenían el plásmido con inserción, los plásmidos se aislaron usando un kit QIAgen Miniprep (QIAgen, Venlo, Los Países Bajos). Se usó un máximo de 100 clones por muestra. Para cada cepa aislada de plásmido se realizó una PCR de secuenciación con el cebador T7 dirigido a la porción variable de ADN_r 16S, TAATACGACTCACTATAGGG. La secuencia resultante se usó para identificar el tipo bacteriano original en la base de datos BLAST. Todos los resultados estuvieron relacionados con el número total de clones que se analizó para obtener el porcentaje de la población que se representa por un tipo bacteriano específico. Así, cuando se analizaron 100 clones y 20 dieron la secuencia para *Lactobacillus crispatus*, el 20 % de la población fue *Lactobacillus crispatus*.

El enfoque de PCR de los presentes inventores da un análisis cualitativo de la población bacteriana en la muestra de orina original. No se realizaron cultivos que dan datos cuantitativos en estas mujeres sin síntomas de infección.

Estadística. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa PASW 17.0 (SPSS). Se probaron diferencias entre la 1ª y 2ª muestra dentro de grupos para significancia con una prueba de la t de Student para datos emparejados. Se probaron diferencias entre grupos con una prueba de la t de Student para datos independientes con varianza igual de los dos grupos.

Se obtuvieron modelos predictivos por análisis de regresión binomial.

Resultados

Composición y estabilidad de la población bacteriana

Todas las muestras de orina tuvieron poblaciones bacterianas que consistieron en 1 a 10 tipos bacterianos. La Tabla 2 muestra los resultados para 2 mujeres, una de las cuales se quedó embarazada y una que no se quedó embarazada. Aparte de los diversos tipos de bacterias que se encuentran, también es de interés determinar cómo de estables son estas poblaciones bacterianas con el tiempo en mujeres que llegan a quedarse embarazadas o no. Una primera medida de la estabilidad es mirar cualitativamente el número de tipos bacterianos de la 1ª muestra que se encuentra de nuevo en la 2ª muestra. En la Tabla 2, esto se representa en números en negrita. Así, para las mujeres embarazadas, 3 de los 4 tipos bacterianos (75 %) siguieron presentes durante un periodo de tiempo de >16 semanas (*Lactobacillus crispatus* cepa ZDY35b, *Staphylococcus aureus* cepa LA14 y *Pseudomonas acephalítica*, 75 % de solapamiento). En las mujeres que no se quedaron embarazadas el solapamiento fue del 60 %.

5 Una segunda medida de la estabilidad es el solapamiento absoluto en porcentajes entre las dos muestras. Para las mujeres embarazadas el 37 % de la población fue idéntico para ambos momentos de tiempo (12 % de *Lactobacillus crispatus*, 15 % de *Staphylococcus aureus*, 10 % de *Pseudomonas acephalítica*). Se produjo un gran desplazamiento de *Lactobacillus crispatus* a *Staphylococcus aureus*. En las mujeres que no llegaron a quedarse embarazadas, el 79 % de la población fue idéntica antes frente a después de FIV.

Tabla 2

	Embarazadas		No embarazadas	
	1ª muestra	2ª muestra	1ª muestra	2ª muestra
<i>Lactobacillus crispatus</i> cepa ZDY35b	50 %	12 %	27 %	20 %
<i>Staphylococcus aureus</i> cepa LA14	15 %	78 %	53 %	60 %
<i>Pseudomonas acephalítica</i>	30 %	10 %		
<i>Streptomyces</i> sp. SD-Z	5 %	0 %		
<i>Brevundimonas</i> sp. DB5			14 %	0 %
Clon bacteriano no cultivado Toolik_Jun2005_Intertussock_69			6 %	15 %
<i>Streptomyces</i> sp. WYE2			0 %	5 %

Aplicando este análisis a los grupos completos se muestra que:

10 Para el grupo de embarazadas, el número promedio de especies bacterianas fue 4 en ambas muestras. Para el grupo de no embarazadas, este número fue 3 antes y 4 después del intento de FIV/ICSI. En el grupo de embarazadas, en promedio estuvieron presentes $1,9 \pm 1,2$ tipos bacterianos en ambas muestras. Para el grupo de no embarazadas, el número fue $2,1 \pm 0,9$. La variedad de especies no se diferenció significativamente entre ambos grupos.

15 El solapamiento exacto entre la 1ª y 2ª muestra fue significativamente más bajo ($p < 0,001$) en el grupo de embarazadas, 37 ± 23 %, en comparación con el grupo de no embarazadas, 68 ± 24 %.

En general, la población bacteriana fue estable tanto cualitativamente como cuantitativamente en mujeres que no se quedaron embarazadas. En mujeres que se quedaron embarazadas, ocurrieron grandes desplazamientos de la población existente en la abundancia de tipos bacterianos individuales. La naturaleza de este desplazamiento se da a continuación.

20

Tabla 3a: Bacterias identificadas por PCR de ADN- 16S de amplio espectro (>97% de coincidencia) en orina de mujeres antes de un procedimiento de FIV/ICSI satisfactorio. La coincidencia <97% se muestra como (valor)

	1	3	5	8	9	11	17	18	20	22	32	33	34	35	38	39	50	61	63	67	69	87
Número de paciente	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	60	60	60	100	100	100	60	100	60	100	100
número de clones analizados	58	100	70	58	25	48	86	66	66	86	82	52	64	50	75	50	71	70	61	52	57	79
Lactobacillus, todas las especies	58	100	70	58	25	48	86	66	66	86	82	52	64	50	75	50	71	70	61	52	57	79
Lactobacillus crispatus (89 % de coincidencia)	58	100	70	58	25	48	86	66	66	86	82	52	64	50	75	50	71	70	61	52	57	79
Lactobacillus crispatus cepa AG1			70																61		57	36
Lactobacillus crispatus cepa B225					48																	5
Lactobacillus crispatus cepa BJ H33h															75							5
Lactobacillus crispatus clon FX12-5																50						5
Lactobacillus crispatus clon FX32-3											52											5
Lactobacillus crispatus clon FX36-3																				52		5
Lactobacillus crispatus cepa LAB32										82												5
Lactobacillus crispatus cepa TL13																	70					5
Lactobacillus crispatus cepa ZDY35b													64	50								14
Lactobacillus jensenii C72										86							71					9
Staphylococcus, todas las especies	6			45		2					6	16	12	15	25					12	6	45
Staphylococcus aureus											6	16	12							12		18
Staphylococcus aureus FD42	6																					5
Staphylococcus aureus cepa IZBN11																						0
Staphylococcus aureus cepa I65																						0
Staphylococcus aureus cepa LA14														15								5
Staphylococcus aureus clon MT10B_A04																						0
Staphylococcus aureus cepa YT-2															25						6	9
Staphylococcus haemolyticus cepa N11																						0
Staphylococcus epidermidis				45		2																9
Bacillus, todas las especies				30		2		51	22	14		4			50	10		9	4	23		50
Bacillus sp. A12						30																5

<i>Corynebacterium mastitidis</i>				8			5
<i>Corynebacterium</i> sp. clone T0079 (95 % de coincidencia)		3					5
<i>Corynebacterium</i> sp. R603							5
<i>Corynebacterium tuscaniense</i> cepa ISS-5309						10	5
<i>Corynebacterium xerosis</i>							0
Streptococcus, todas las especies		6	2			2	14
<i>Streptococcus</i>							0
<i>Streptococcus anginosus</i> cepa ChDC.YA12							0
<i>Streptococcus anginosus</i> clon UR062			2				5
<i>Streptococcus anginosus</i> cepa VAMC5302		6					5
<i>Streptococcus intermedius</i> cepa TG14 (96 % de coincidencia)						2	5
Streptomyces, todas las especies							5
<i>Streptomyces</i> sp. SC-13							5
<i>Streptomyces</i> sp. SD-Z							0
<i>Streptomyces</i> sp. SX-3							0
Pseudomonas, todas las especies				10	3		9
<i>Pseudomonas acephalatica</i> (96 % de coincidencia)				10			5
<i>Pseudomonas fulva</i>						3	5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>							0
<i>Pseudomonas</i> sp. 5S2.A12							0

Tipos de bacteria y especies dominantes

En total, se encontraron 79 especies bacterianas diferentes, en la Tabla 3 se da una visión general. Para la mayoría de los análisis, la coincidencia entre la secuencia de ADN obtenida y la secuencia específica de especie en el banco de datos BLAST superó el 97 %. Porcentajes de coincidencia más bajos se indican en la tabla. La mayoría de las especies se encontraron en solo algunas muestras. La Tabla 4 representa la frecuencia con la que las especies bacterianas se encontraron.

Tabla 4 Número de especies presentes en una o más muestras.

N muestras	1	2	3	4	5	8	9	11	13	26	58	75
N especies	49	12	3	3	2	1	2	3	1	1	1	1

N muestras = Número de muestras en las que estaba presente una especie específica

N especies = Número de especies para las que se aplica N muestras (así, 49 especies ocurrieron en solo 1 muestra mientras que 1 especie ocurrió en 75 muestras)

Especies secundarias

La mayoría de las especies estuvieron presentes a menos del 10 % de la población de solo 1 mujer y frecuentemente en solo una muestra. En el grupo de embarazadas se encontraron 19 especies en ambos momentos de tiempo (no necesariamente en la misma mujer), 16 fueron únicas para la 1ª muestra y 18 para la 2ª muestra. En el grupo de no embarazadas, 16 especies bacterianas ocurrieron en ambas muestras, 14 fueron únicas para la 1ª muestra y 25 para la 2ª muestra. No hubo especies bacterianas únicas para los cuatro grupos de muestra diferentes (No embarazadas, embarazadas, fracaso previo de FIV/ICSI, después del fracaso de FIV/ICSI).

Especies principales

Ocurrieron cinco especies en los 4 grupos de muestra. Estuvieron presentes *Lactobacillus crispatus* y *Staphylococcus aureus* en la mayoría de las muestras. Estuvieron presentes *E. coli*, *Streptomyces sp.* y la cepa aislada de bacterias sin cultivar CH96Fc_H10 en menos muestras, pero también en los 4 grupos.

Especies dominantes (fracción más grande de la población total)

El porcentaje promedio ocupado por una especie dominante para los 4 grupos de muestra fue respectivamente 67±16 % (grupo de embarazadas de 1ª muestra, intervalo 48 % al 100 %), 59±18 % (grupo de embarazadas de 2ª muestra, intervalo 22 % al 88 %), 56 ± 15 % (grupo de no embarazadas de 1ª muestra, intervalo 20 % al 100 %) y 57±17 % (grupo de no embarazadas de 2ª muestra, intervalo 18 % al 100 %). Una visión general de las especies dominantes se da en la Tabla 5.

Tabla 5 Especies dominantes (18 % al 100 %)					
Grupo de embarazadas			Grupo de no embarazadas		
N.º	primera muestra	segunda muestra	N.º	primera muestra	segunda muestra
10	Lc	Sa	6	Sa	Sa
4	Lc	Lc	6	Lc	Lc
2	Lc	B RG4	2	Lc	Sa
1	Lc	B CPB8	2	Li	Li
1	Lc	Msb	1	Lcu	Lcu
1	Lc	S	1	Bc	Lc
1	Lj	B RG4	1	Cc	Cc
1	Lj	Sa	1	UbB	UbE
1	B RG4	B RG4			

Lc= Lactobacillus crispatus, Lcu= Lactobacillus curvatus clon B225, Li= Lactobacillus inners, Lj= Lactobacillus jensenii cepa aislada C72, Sa= Staphylococcus aureus, B RG4= Bacillus sp. RG4, Bcpb= Bacillus sp. CPB 8, Msb=

Tabla 5 Especies dominantes (18 % al 100 %)					
Grupo de embarazadas			Grupo de no embarazadas		
N.º	primera muestra	segunda muestra	N.º	primera muestra	segunda muestra
<i>bacteria de sedimentos marinos ISA-3195, S= Sphingomonas sp. FL13-1-1, Cc= Clostridium crispatus cTPY-17, Bc= Bacillus clausii cepa za-w-3, UbB= Clon bacteriano no cultivado Bermudas8-E3, UbE= Clon bacteriano no cultivado E67BE-207</i>					

5 En el grupo de embarazadas, las diversas cepas de *Lactobacillus* fueron las especies dominantes en 21 de las 22 muestras tomadas en el primer momento de tiempo y en 4 muestras tomadas durante el embarazo. Durante el embarazo, *Staphylococcus aureus* fue la especie dominante más frecuente. En 5 de las 22 mujeres, la especie dominante fue idéntica para ambas muestras.

En el grupo de no embarazadas, la especie dominante en la primera muestra fue una especie de *Lactobacillus* para 11 de las 20 mujeres. En 6 muestras fue *Staphylococcus aureus*. La especie dominante fue la misma en ambas muestras para 16 de las 20 mujeres.

10 Basándose en el tipo de especies dominantes, la población bacteriana parece estable en el procedimiento de FIV fallido (ningún efecto del procedimiento de FIV) y experimenta fuertes cambios durante el embarazo.

Cambios específicos en la población bacteriana durante el embarazo y después de FIV.

Los desplazamientos en la abundancia de especies bacterianas que se producen durante el embarazo son principalmente una disminución de especies de *Lactobacillus* del 62±21 % al 18±16 % (p<0,0001), y aumentos en especies de *Staphylococcus* del 7±11 % al 41±29 % (p<0,0001).

15 En el grupo de no embarazadas, la abundancia en la 1ª frente a la 2ª muestra no cambió para ninguna de las especies de *Lactobacillus*, 46±24 frente a 40±27, y las especies de *Staphylococcus*, 27±22 frente a 32±25.

20 Para la comparación anterior, las siete mujeres que no estaban embarazadas durante la recogida de la 2ª muestra, pero que se quedaron embarazadas en algún otro momento de tiempo después de la recogida de la 1ª muestra, se asignaron al grupo de no embarazadas. Cuatro de las 7 no tuvieron *Staphylococcus* en su 1ª muestra. Dos tuvieron una alta presencia de *Staphylococcus* y se quedaron embarazadas en el 2º o 3º año de seguimiento (una tuvo un aborto natural; una tuvo un aborto natural seguido de un embarazo espontáneo satisfactorio después de dos años). La séptima mujer tuvo una alta presencia de *Staphylococcus*, un ICSI fallido tras el primer intento de FIV fallido y luego se quedó embarazada espontáneamente en el plazo de 1 año (aborto natural).

Relación de población bacteriana con respecto a IVU previa o uso de antibióticos.

25 Del grupo de embarazadas, 5 mujeres (23 %) informaron que habían tenido una IVU en el pasado y 2 (9 %) habían usado recientemente antibióticos. Del grupo de no embarazadas, 9 mujeres (45 %) tuvieron una IVU previamente y 5 (25 %) habían usado recientemente antibióticos. Las diferencias fueron estadísticamente no significativas. La composición de las poblaciones bacterianas en las mujeres que informaron una IVU previa o uso de antibióticos no se diferenció significativamente de aquella en las otras mujeres de sus grupos respectivos.

30 *Población bacteriana antes de FIV/ ICSI frente al desenlace de FIV/ICSI*

La orina obtenida antes del procedimiento de FIV/ICSI contuvo más especies de *Staphylococcus* (27±22 % frente a 7±11 %, p<0,001) y menos especies de *Lactobacillus* (46±24 % frente a 62±21 %, p<0,001) para el grupo de no embarazadas en comparación con el grupo de embarazadas.

Causas principales de IVU e infección vaginal en mujeres embarazadas y no embarazadas

35 En 2009, se realizaron un número total de 599 cultivos de orina y 206 cultivos de exudado vaginal para mujeres que asistieron al Hospital de Maternidad en Erbil (región de Kurdistán, Irak). En la Tabla 6 se muestran los resultados para mujeres que estuvieron respectivamente embarazadas o no embarazadas. En mujeres que no están embarazadas se encontró *E. coli* en el 44 % (70/158) de todos los cultivos de orina positivos y *Staphylococcus aureus* en el 22 % (35/158). En mujeres embarazadas se encontró *E. coli* en el 21 % (75/350) y *Staphylococcus aureus* en el 50 % (175/350).

45 Para exudado vaginal, *E. coli* fue el patógeno encontrado en el 29 % (24/84) y *Staphylococcus* en el 29 % (25/84) de todos los exudados positivos en mujeres que no estuvieron embarazadas. Para mujeres embarazadas, los números fueron del 38 % (28/74) para *E. coli* y del 49 % (36/74) para *Staphylococcus aureus*. Para orina y a un menor grado para exudado vaginal hubo un desplazamiento hacia elevada presencia de *Staphylococcus aureus* durante el embarazo (p<0,001) y disminuida presencia de *E. coli* (p<0,001).

Tabla 6

	total	neg.	pos.	pseudo.	E. coli	Kleb.	Staph. a	Enterob.	Portus sp.	Streptoc.
Orina										
Embarazadas	389	39	350	0	75	17	175	69	11	3
No embarazadas	210	52	158	1	70	4	35	39	6	3
Exudado vaginal										
Embarazadas	122	48	74	0	28	4	36	3	1	2
No embarazadas	94	10	84	0	24	14	25	18	3	0
<i>Pseudo.</i> = especie de <i>Pseudomonas</i> , <i>Kleb.</i> = especie de <i>Klebsiella</i> , <i>Enterob.</i> = especie de <i>Enterobacter</i> , <i>Streptoc.</i> = especie de <i>Streptococcus</i> .										

Modelos de predicción para la probabilidad de éxito de FIV ICSI

5 Se construyeron los modelos por análisis de regresión binomial con entrada de las especies bacterianas identificadas en la 1ª muestra de orina (antes de FIV/ICSI, n=42). Especies de *Lactobacillus* y especies de *Staphylococcus* contribuyeron significativamente al modelo. La mejor predicción del embarazo después de la primera FIV/ICSI se obtuvo con el modelo $Y = 0,030 * \% \text{ de } Lactobacillus - 0,057 * \% \text{ de } Staphylococcus - 1,031$. Cuando la paciente 58 se asignó al grupo de embarazadas (se quedó embarazada aproximadamente en el momento que se recogió la 1ª muestra), la ecuación quedó $Y = 0,034 * \% \text{ de } Lactobacillus - 0,064 * \% \text{ de } Staphylococcus - 0,668$ y el % predijo correctamente que las embarazadas aumentaron del 86 % al 96 %. Para la predicción del 1 año, la ecuación fue $Y = 0,051 * \% \text{ de } Lactobacillus - 0,056 * \% \text{ de } Staphylococcus - 1,053$. La Tabla 7 muestra los valores de tabla cruzados para el modelo de primer intento de FIV/ICSI y el modelo de periodo de 1 año. En el modelo de periodo de 1 año se hicieron múltiples intentos de FIV/ ICSI.

Tabla 7.

		Predicho					
		Primer intento		% de correcto	1 año		% de correcto
		no embarazadas	embarazadas		no embarazadas	embarazadas	
observado	No embarazadas	16	4	80	12	4	75
	embarazadas	3	19	86	2	24	92,3

15 Las curvas de ROC para los dos modelos muestran que a partir del área bajo la curva (0,819, el 1º intento y 0,901, 1 año) parece que podría predecirse bien el embarazo en el plazo de 1 año. En esta predicción de 1 año la causa de esterilidad fue masculina para 3 de las cuatro predicciones de positivo falso y 1 de las 2 predicciones de negativo falso. La causa fue desconocida para 1 de las 4 predicciones de positivo falso y 1 de las 2 predicciones de negativo falso.

20 Para probar si existe una relación entre la causa de la esterilidad y la potencia predictiva del modelo de los presentes inventores, los presentes inventores subdividieron las mujeres en causas conocidas de esterilidad (n=30) y causas desconocidas de esterilidad (n=12) [Tabla 8].

Tabla 8.

		Predicción de 1 año					
		Causas conocidas		% de correcto	Causas desconocidas		% de correcto
		no embarazadas	embarazadas		no embarazadas	embarazadas	
observado	no embarazadas	6	4	60	6	0	100
	embarazadas	1	24	96	1	5	83

5 Para las mujeres que no estaban embarazadas durante la recogida de la segunda muestra, n=20, se empezaron nuevos intentos de FIV/ICSI. Se usó el modelo de predicción de 1 año basándose en la 2ª muestra si estas mujeres se quedarán embarazadas por estos nuevos intentos en el plazo de los siguientes 12 meses. Cuatro mujeres se quedaron embarazadas en ese periodo (pacientes 10, 14, 19 y 58). La Tabla 9 muestra el desenlace real frente al desenlace predicho por el modelo. La predicción de que nuevos intentos no producirían embarazo fue correcta en 14/15 casos (93 %).

Tabla 9

		Predicho		% de correcto
		no embarazadas	embarazadas	
observado	no embarazadas	14	2	88
	embarazadas	1	3	75

10 Cuando el modelo se aplicó a la orinas obtenidas en la 16ª semana del embarazo, el modelo predijo que ninguna de estas mujeres se quedaría embarazada de un procedimiento de FIV/ ICSI posterior.

Modelo dejando uno fuera

15 Para validar el modelo de predicción, los presentes inventores aplicaron un procedimiento de dejar uno fuera. En este procedimiento se construyó un modelo a partir de los datos de 41 pacientes y este modelo se aplicó a los datos de la orina de la paciente que se dejó fuera de la predicción de si esta paciente se quedaría o no embarazada en el plazo de 1 año desde que empezó con FIV/ICSI. Los resultados (Tabla 10) coinciden completamente con aquellos obtenidos con el grupo total de 42 (Tabla 7).

Tabla 10

		Predicho		% de correcto
		no embarazadas	embarazadas	
observado	no embarazadas	12	4	75
	embarazadas	2	24	92

20 En el grupo de validación, el modelo predijo correctamente 24 de los 28 embarazos y 12 de los 16 fracasos (Tabla 10).

Comparación con el modelo existente [5]

25 En el modelo de Nelson, la probabilidad individual de un parto se predice basándose en la edad, duración del deseo de tener hijos y varios otros parámetros clínicos. Los presentes inventores entraron estos datos para el grupo de estudio de los presentes inventores en el modelo y compararon su desenlace para las mujeres con parto observado en el plazo de 1 año frente a las mujeres sin parto (Tabla 11). La probabilidad predicha no se diferenció para ambos grupos ($p=0,18$, prueba de la t para datos independientes)

Tabla 11

		% de probabilidad de parto (modelo de Nelson)	
		Promedio	d.e.
observado	no embarazadas	27	9
	embarazadas	23	11

Ejemplo 2

qPCR para especies de *Staphylococcus* y especies de *Lactobacillus*

- 5 Como el modelo de predicción como se muestra en el Ejemplo 1 solo usa datos de la presencia de *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y número total de bacterias presentes, se decidió desarrollar un procedimiento de qPCR específicamente dirigido a medir aquellos tres valores.

10 En una muestra de orina se realiza una PCR con el conjunto de cebadores general (EUB-R, EUB-L). El producto de esta PCR es una mezcla de ADNr 16S derivados de todas las bacterias en la orina, y así representativo del número total de bacterias.

Posteriormente, en esta mezcla total se realiza una qPCR con tres conjuntos de cebadores, un conjunto de cebadores general, un conjunto de cebadores específico para (múltiples tipos de) *Lactobacillus* y un conjunto de cebadores específico para (múltiples tipos de) *Staphylococcus*.

15 El contenido de ADN total del producto de PCR inicial se mide mediante un ensayo Nanodrop. El ADN en este análisis casi comprende totalmente ADNr 16S. Basándose en este análisis Nanodrop, la cantidad total de ADN en cada ensayo puede mantenerse igual.

20 El cebador general reaccionará con todos los fragmentos de ADNr 16S y así producirá el valor de CT que define el 100 % de la población bacteriana. El conjunto de cebadores general también se probarán en una serie de dilución del producto de PCR inicial (1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1). Esta serie de dilución producirá un valor de CT que coincide con una cantidad de ADN de aproximadamente el 80 %, 60 %, 40 %, 20 % y 10 %, respectivamente, del total.

Los ensayos de qPCR con los conjuntos de cebadores específicos producirán un valor de CT que es igual al valor de CT obtenido con el conjunto de cebadores general (si la población solo contiene una especie) o más alto (si la especie probada es solo parte de la población total). Basándose en la serie de dilución, puede determinarse qué porcentaje coincide con este valor de CT específico.

- 25 Conjunto de cebadores de *Staphylococcus aureus* (como se publica en: Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. Rasolofo EA, St-Gelais D, LaPointe G, Roy D. Int J Food Microbiol. 2010 Mar 31;138(1-2):108-18. Publicación electrónica 20 de enero de 2010):

Cebador directo (nt 61) 5'-GAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGAC-3'

Cebador inverso (nt 241) 5'-GCATCGTTGCCTTGGTAAGC-3'

30 Tamaño de fragmento 201 pb

Conjunto de cebadores de *Lactobacillus crispatus* (como se publica en: Quantitative PCR Assessments of Bacterial Species in Women with and without Bacterial Vaginosis. Marcela Zozaya-Hinchliffe, Rebecca Lillis, David H. Martin, and Michael J. Ferris, J Clin Microbiol. 2010 May; 48(5): 1812-1819; publicado en línea el 19 de marzo de 2010. doi: 10.1128/JCM.00851-09. PMID: PMC2863870)

35 Cebador directo GATTTACTTCGGTAATGACGTTAGGA

Cebador inverso AGCTGATCATGCGATCTGCTTTC

REIVINDICACIONES

1. Método de predicción de la probabilidad de un embarazo satisfactorio o no satisfactorio en un sujeto, preferentemente en el que el sujeto está sometiéndose a o es elegible para un método de inseminación artificial, tal como FIV o ICSI, que comprende las etapas de:

- 5 a. Tomar una muestra de orina o vaginal;
- b. Determinar la cantidad de bacterias que pertenecen al grupo de *Lactobacillaceae*, preferentemente una especie de *Lactobacillus*, y bacterias que pertenecen a una especie de *Staphylococcus* como un porcentaje de la cantidad total de bacterias presentes en dicha muestra; y
- 10 c. Predecir la probabilidad de un embarazo satisfactorio en el que la probabilidad de un embarazo satisfactorio se determina por la fórmula:

$$Y = a * (\% \text{ de } Lactobacillus) - b * (\% \text{ de } Staphylococcus) - c$$

en la que

a tiene un valor de 0,025 a 0,051, preferentemente un valor de 0,025 a 0,04;

b tiene un valor de 0,04 a 0,07, preferentemente un valor de 0,04 a 0,06;

15 c tiene un valor de -1,10 a -0,66, preferentemente un valor de -1,06 a -0,9, más preferentemente de -1,06 a -1,01;

% de *Lactobacillus* es la cantidad de bacterias *Lactobacillus* expresada como el porcentaje de la cantidad total de bacterias;

20 % de *Staphylococcus* es la cantidad de bacterias *Staphylococcus* expresada como el porcentaje de la cantidad total de bacterias;

y en la que Y representa la probabilidad de éxito.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la especie de *Lactobacillus* es *Lactobacillus crispatus*.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la especie de *Staphylococcus* es *Staphylococcus aureus*.

25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la medición de la cantidad de las bacterias se realiza por PCR, más preferentemente qPCR, preferentemente en el que *Staphylococcus* se determina usando los cebadores 5'-GAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGAC-3' y 5'-GCATCGTTGCCTTGGTAAGC-3'.

5. Método según la reivindicación 4, en el que *Lactobacillus* se determina usando los cebadores 5'-GATTTACTTCGGTAATGACGTTAGGA-3' y 5'-AGCTGATCATGCGATCTGCTTTC-3'.

30 6. Método según las reivindicaciones 1-4, en el que la medición de la cantidad de las bacterias se realiza por espectrometría de masas, más preferentemente espectrometría de masas por MALDI-TOF.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que las bacterias se detectan en una muestra de orina, preferentemente una muestra de orina del chorro medio.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la muestra vaginal es un exudado vaginal.

35 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que predecir la probabilidad de un embarazo satisfactorio o no satisfactorio es predecir la probabilidad de una implantación satisfactoria o no satisfactoria del óvulo fecundado en el útero.

10. Kit para la predicción de la probabilidad de un embarazo satisfactorio, que comprende:

a. Medios para medir el contenido total de bacterias en una muestra de un sujeto;

40 b. Medios para medir el contenido de bacterias de *Lactobacillus*, preferentemente en el que dichos medios comprenden los cebadores 5'-GATTTACTTCGGTAATGACGTTAGGA-3' y 5'-AGCTGATCATGCGATCTGCTTTC-3';

45 c. Medios para medir el contenido de bacterias de *Staphylococcus*, preferentemente en el que dichos medios comprenden los cebadores 5'-GAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGAC-3' y 5'-GCATCGTTGCCTTGGTAAGC-3';

d. Medios dispuestos para calcular la probabilidad según la fórmula definida en la reivindicación 1, en el que los medios dispuestos para calcular la probabilidad comprenden un procesador que es capaz de recibir los valores de contenido bacteriano medido como entrada, y que calcula la probabilidad según la fórmula como se define en la reivindicación 1.

- 5 11. Kit según la reivindicación 10, en el que los medios para medir el contenido total de bacterias en una muestra de un sujeto comprenden un conjunto de cebadores general específico para ADNr 16S bacteriano.
12. Kit según la reivindicación 11, en el que el conjunto de cebadores general comprende al menos un cebador EUB directo y al menos uno inverso.
- 10 13. Kit según la reivindicación 12, en el que el procesador es capaz de dar como resultado la probabilidad a un medio de señalización que puede ser leído por la persona que usa el kit.