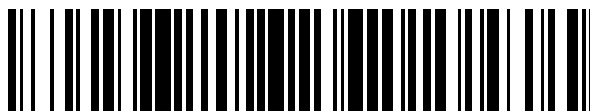


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 589**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/24 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2013 PCT/US2013/041159**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173466**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2013 E 13728020 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2850204**

54 Título: **Métodos para la inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes para caracterización y/o identificación usando espectrometría de masas**

30 Prioridad:

17.05.2012 US 201261648420 P

14.03.2013 US 201313828119

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

21.11.2018

73 Titular/es:

BIOMÉRIEUX, INC. (100.0%)

**100 Rodolphe Street
Durham, NC 27712, US**

72 Inventor/es:

**HYMAN, JONES M.;
DEOL, PARAMPAL;
MILLER, ELIZABETH;
GIRARD, VICTORIA;
GATES, AMBER;
MAILLER, SANDRINE;
ARSAC, MAUD y
WALSH, JOHN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 690 589 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes para caracterización y/o identificación usando espectrometría de masas

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente de EE. UU. núm. 13/828,119 titulada «Methods for Inactivation and Extraction of Acid-Fast Bacteria for Characterization and/or Identification Using Mass Spectrometry», presentada el 14 de marzo de 2013 y la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. núm. 61/648,420, titulada «Methods for Inactivation and Extraction of Mycobacteria for Characterization and/or Identification using Mass Spectrometry», presentada el 17 de mayo de 2012.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para la inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes tales como micobacterias y nocardias. En particular, la presente invención se refiere a un método para la caracterización y/o identificación rápidas de micobacterias o nocardias en una muestra de prueba usando espectrometría de masas.

Antecedentes de la invención

- 15 Las pruebas fenotípicas de identificación automatizadas tradicionales, tales como los sistemas Vitek®, Phoenix™ y Microscan® o las pruebas fenotípicas manuales tales como API requieren que los microorganismos estén en una fase de crecimiento apropiada y estén libres de medios y productos sanguíneos que interferieran para proporcionar resultados robustos. Estos sistemas usan crecimiento de colonias a partir del caldo positivo durante 18-24 horas en medios de cultivo en placa. Sin embargo, en un esfuerzo por obtener mejores resultados, algunos laboratorios han informado acerca del uso de estos sistemas con microorganismos aislados de frascos de hemocultivo positivo. Estas pruebas directas del frasco no son apropiadas para todos los microorganismos (por ejemplo, cocos grampositivos), no están validadas por los fabricantes de las pruebas y, en general, lleva de 3 a 8 horas proporcionar resultados. Se requieren urgentemente pruebas específicas más rápidas y más amplias para proporcionar al médico resultados clínicamente relevantes en las primeras horas, preferiblemente en una hora después de un resultado positivo del cultivo.

- 20 Los métodos de espectrometría de masas tienen el potencial de permitir la identificación de microorganismos muy rápidamente, pero pueden encontrar interferencia de muchos compuestos presentes en el medio de cultivo microbiológico líquido y en muestras clínicas tales como sangre o sus combinaciones. Los métodos más comúnmente empleados para recuperar microorganismos directamente de caldo de hemocultivo positivo son centrifugación diferencial en dos etapas y centrifugación en un tubo separador de suero.

Se describen otros métodos para la separación, caracterización y/o identificación de microorganismos, incluyen Ingebretsen ET AL; 2012, describen la extracción de micobacterias de muestras en donde se incuban las células en etanol primero y después se centrifugan, se secan, se resuspenden en acetonitrilo y, con posterioridad, se agitan con perlas.

- 35 La Patente de EE. UU. número 6,177,266 describe un método para la clasificación quimiotaxonómica de bacterias con biomarcadores específicos del género, la especie y la cepa generados por análisis por espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) de extractos de proteína celular o células enteras.

- 40 Sin embargo, queda la necesidad en la técnica de protocolos eficaces y rápidos para la inactivación y/o extracción de muestras de prueba de microorganismos para análisis, caracterización y/o identificación posteriores por espectrometría de masas. En particular, la inactivación, o muerte celular, con frecuencia es necesaria para la posterior manipulación de bacterias acidorresistentes, tales como micobacterias y nocardias, fuera de un entorno de nivel de bioseguridad 3 (BSL-s/P3).

Sumario de la invención

- 45 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para inactivación y/o extracción de bacterias acidorresistentes en una muestra de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas secuenciales: (a) adquirir una muestra de prueba de un medio de cultivo sólido o semisólido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) y suspender la muestra de prueba en un recipiente que contiene etanol y perlas; (b) tratar en un homogeneizador tipo *beadbeater* y/o someter a agitación vorticial el recipiente para separar los pequeños agregados y/o romper las células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente e (c) incubar, con posterioridad, la suspensión durante al menos 10 minutos para inactivar las bacterias acidorresistentes contenidas en la muestra de prueba. Las muestras de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) pueden adquirirse del medio de cultivo sólido o semisólido usando un asa bacteriológica o un hisopo.

El alcance de protección se define por las reivindicaciones adjuntas.

En una configuración, el recipiente en la etapa (a) puede contener desde aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 % de etanol, por ejemplo, el recipiente puede contener aproximadamente un 70 % de etanol. El método puede comprender además tratar en un homogeneizador tipo *beadbeater* o someter a agitación vorticial el recipiente en la etapa (b) durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos. En otra configuración, las perlas son perlas de vidrio de 0.5 mm. En una configuración, la posterior etapa (c) de incubación comprende una incubación durante al menos aproximadamente 3 minutos o al menos aproximadamente 10 minutos. En otra realización, la incubación en la etapa (c) es a temperatura ambiente.

En otra realización, el método puede comprender además las siguientes etapas secuenciales adicionales: (d) centrifugar el recipiente para sedimentar las muestras de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) y retirar el sobrenadante; (e) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en ácido fórmico y (f) añadir, con posterioridad, acetonitrilo al recipiente. Opcionalmente, el método comprende además la centrifugación de la muestra de prueba en el recipiente después de la etapa (f). En otra realización opcional, puede aplicarse el sobrenadante de la etapa (d) directamente, o como suspensión acuosa, a una lámina o placa para espectrometría de masas.

Puede resuspenderse el sedimento en la etapa (d) usando desde aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 90 % de ácido fórmico o usando aproximadamente un 70 % de ácido fórmico. Después de resuspender el sedimento, puede añadirse acetonitrilo para obtener una concentración final de aproximadamente un 35 % a aproximadamente un 65 % de acetonitrilo o para obtener una concentración final de aproximadamente el 50 %. En una configuración, puede resuspenderse el sedimento en aproximadamente 10 µl de ácido fórmico en la etapa (e) y pueden añadirse aproximadamente 10 µl de acetonitrilo al sedimento resuspendido en la etapa (f).

Según otra realización, el método comprende además las siguientes etapas secuenciales adicionales: (g) transferir una alícuota del sobrenadante de la etapa (f) a una lámina de objetivo para espectrometría de masas y añadir una disolución de matriz al sobrenadante y (h) examinar la muestra de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba por comparación de uno o más espectros de masas medidos con uno o más espectros de masas de referencia. Opcionalmente, la etapa (g) comprende transferir una alícuota de la muestra de prueba obtenida después de la etapa (f) a una lámina o placa para espectrometría de masas, permitir que se seque la alícuota y añadir, con posterioridad, una matriz. Puede usarse cualquier matriz conocida, por ejemplo, la matriz puede ser ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, en inglés). Según la presente invención, puede usarse el método para inactivación y/o extracción de micobacterias o nocardias para posterior caracterización y/o identificación. Por ejemplo, pueden identificarse micobacterias o nocardias a nivel de familia, género, especie y/o cepa usando espectrometría de masas, por ejemplo, usando espectrometría de masas MALDI-TOF.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método que comprende las siguientes etapas secuenciales: (a) adquirir una muestra de prueba de un medio de cultivo líquido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) y añadir la muestra de prueba a un recipiente; (b) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba y retirar, con posterioridad, el sobrenadante; (c) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en etanol y añadir perlas al recipiente; (d) tratar en un homogeneizador tipo *beadbeater* y/o someter a agitación vorticial el recipiente para separar los pequeños agregados y/o romper las células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente e (e) incubar, con posterioridad, la suspensión durante al menos 10 minutos para inactivar las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) contenidas en la muestra de prueba.

En una configuración, puede resuspenderse el sedimento de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) en la etapa (c) en desde aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 % de etanol, por ejemplo, puede resuspenderse el sedimento en aproximadamente un 70 % de etanol. El método puede comprender además tratar en un homogeneizador tipo *beadbeater* y/o someter a agitación vorticial el recipiente en la etapa (d) durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos. En una configuración, las perlas son perlas de vidrio de 0.5 mm. En una configuración, la etapa (e) de incubación posterior comprende una incubación durante al menos aproximadamente 3 minutos o al menos aproximadamente 10 minutos. En otra realización, la incubación en la etapa (e) es a temperatura ambiente.

En otra realización, el método puede comprender además las siguientes etapas secuenciales adicionales: (f) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes inactivadas (por ejemplo, micobacterias o nocardias) y retirar, con posterioridad, el sobrenadante; (g) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en ácido fórmico y (h) añadir acetonitrilo al recipiente. Opcionalmente, puede aplicarse el sobrenadante de la etapa (f) directamente, o como una suspensión acuosa, a una lámina o placa para espectrometría de masas.

Puede resuspenderse el sedimento en la etapa (g) usando desde aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 90 % de ácido fórmico, por ejemplo, puede resuspenderse el sedimento usando un 70 % de ácido fórmico. Después de resuspender el sedimento, puede añadirse acetonitrilo para obtener una concentración final de desde

aproximadamente un 35 % a aproximadamente un 65 %, por ejemplo, para obtener una concentración final de aproximadamente el 50 %. En una realización, puede resuspenderse el sedimento en 10 μ l de ácido fórmico en la etapa (h) y pueden añadirse 10 μ l de acetonitrilo al sedimento resuspendido en la etapa (g).

5 Según esta realización, el método puede comprender además las siguientes etapas secuenciales adicionales: (i) transferir una alícuota del sobrenadante de la etapa (h) a una lámina de objetivo para espectrometría de masas y añadir una disolución de matriz y (j) examinar la muestra de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba por comparación del espectro de masas medido con uno o más espectros de masas de referencia. Opcionalmente, la etapa (i) comprende transferir una alícuota (por ejemplo, 1 μ l) de la muestra de prueba obtenida de la etapa (h) a una lámina o placa para espectrometría de masas, permitir que se seque la alícuota y añadir, con posterioridad, una matriz. Puede usarse cualquier matriz conocida, por ejemplo, la matriz puede ser ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA). Según la presente invención, las bacterias acidorresistentes pueden identificarse al nivel de género, especie y/o cepa usando espectrometría de masas, por ejemplo, espectrometría de masas MALDI-TOF.

15 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para la inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) en una muestra de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas secuenciales: (a) adquirir una muestra de prueba a partir de un medio de cultivo sólido o semisólido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes y suspender la muestra de prueba en un recipiente que contiene etanol al 70 % y perlas de vidrio de 0.5 mm; (b) tratar en un homogeneizador tipo *beadbeater* y/o someter a agitación vorticial el recipiente para separar los pequeños agregados y/o romper las células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente; (c) incubar, con posterioridad, la suspensión durante al menos aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente para inactivar las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) contenidas en la muestra de prueba; (d) centrifugar el recipiente para sedimentar la muestra de bacterias acidorresistentes y retirar el sobrenadante; (e) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en al menos 3 μ l con ácido fórmico; (f) añadir al menos 3 μ l de acetonitrilo al recipiente; (g) transferir una alícuota del sobrenadante de la etapa (f) a una lámina de objetivo para espectrometría de masas y añadir una disolución de matriz al sobrenadante y (h) examinar la muestra de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba por comparación de uno o más espectros de masas medidos con uno o más espectros de masas de referencia. Según la presente invención, las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) pueden identificarse a nivel de género, especie y/o cepa, por ejemplo, usando espectrometría de masas MALDI-TOF.

35 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) en una muestra de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas secuenciales: (a) adquirir una muestra de prueba a partir de un medio de cultivo líquido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes y añadir la muestra de prueba a un recipiente, centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba y retirar, con posterioridad, el sobrenadante; (b) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en etanol; (c) añadir, con posterioridad, perlas de vidrio de 0.5 mm al recipiente; (d) tratar en un homogeneizador tipo *beadbeater* y/o someter a agitación vorticial el recipiente para separar los pequeños agregados y/o romper las células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente; (e) incubar, con posterioridad, la suspensión durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente para inactivar las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) contenidas en la muestra de prueba; (f) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes inactivadas y retirar con posterioridad el sobrenadante; (g) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en ácido fórmico; (h) añadir, con posterioridad, acetonitrilo al recipiente; (i) transferir una alícuota del sobrenadante de la etapa (h) a una lámina de objetivo para espectrometría de masas y añadir una disolución de matriz al sobrenadante y (j) examinar la muestra de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba por comparación del espectro de masas medido con uno o más espectros de masas de referencia. Según la presente invención, las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) pueden identificarse a nivel de género, especie y/o cepa, por ejemplo, usando espectrometría de masas MALDI-TOF.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 - muestra un diagrama de flujo de un método para inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) de un medio sólido o semisólido, según una realización de la presente invención.

Figura 2 - muestra un diagrama de flujo de un método para inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) de un medio líquido, según otra realización de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede expresarse en diferentes formas y no debería interpretarse como limitada a las

realizaciones explicadas en la misma. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta descripción sea rigurosa y completa y transmita completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia. Por ejemplo, los elementos ilustrados con respecto a una realización pueden incorporarse en otras realizaciones y los elementos ilustrados con respecto a una realización particular pueden suprimirse de esa realización. Además, serán evidentes para los expertos en la materia numerosas variaciones y adiciones a las realizaciones sugeridas en la presente memoria a la luz de la descripción inmediata, que no se desvíen de la invención inmediata.

El presente sistema VITEK® MS del cesionario (bioMérieux, Inc., St. Louis, MO) proporciona una plataforma para identificación bacteriana usando un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) para analizar el perfil proteínico de una muestra y hacerlo coincidir con una base de datos de perfiles de organismos conocidos. Se inoculan las muestras sobre una lámina de objetivo, se cubren con una matriz (por ejemplo, matriz de CHCA (matriz de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico)) y se trata después mediante el espectrómetro de masas.

Se pueden analizar los microorganismos clínicamente relevantes más comunes inoculando células directamente sobre la lámina de objetivo VITEK® MS. La preparación de muestras de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) para análisis difiere del procedimiento estándar por que es necesaria una etapa de inactivación para hacer seguras las muestras para manipulación fuera de un entorno de bioseguridad nivel 3 (BSL-3/P3).

Los presentes solicitantes han encontrado que la incubación en etanol junto con la ruptura mecánica proporcionan un método eficaz y rápido para la inactivación de bacterias acidorresistentes. Se muestra que la exposición de etanol es eficaz cuando se usa un procedimiento que implica una etapa de ruptura mecánica seguida por una etapa de inactivación posterior incubando la muestra rota en etanol a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos. En una realización, la ruptura mecánica se realiza usando un homogeneizador tipo *beadbeater* (BioSpec. Bartlesville, OK), un homogeneizador que rompe las células agitando un vial de microcentrífuga sellado que contiene muestra, disolución de extracción y perlas (por ejemplo, perlas de vidrio diminutas). Típicamente, las perlas pueden ser perlas conocidas cualesquiera que puedan operar para romper células en un recipiente o tubo de microcentrífuga. Por ejemplo, las perlas pueden ser perlas de vidrio, cerámica, circonia, silicio, metal, acero, carburo de tungsteno, granate, arena o zafiro. En una configuración, la perla puede ser de aproximadamente 0.1 mm a aproximadamente 1 mm de tamaño, por ejemplo, aproximadamente 0.5 mm de tamaño.

Pueden usarse después etapas de tratamiento adicionales para ayudar a extraer las proteínas celulares de las células inactivadas para proporcionar espectros claros y consistentes. Por ejemplo, puede usarse una etapa de tratamiento en ácido fórmico seguida por exposición a acetonitrilo para extraer y disolver proteínas para posterior análisis (por ejemplo, por espectrometría de masas).

La presente invención proporciona métodos para inactivación, extracción, caracterización y/o identificación de una bacteria acidorresistente desconocida en una muestra de prueba. La presente invención también se refiere a un método para caracterización y/o identificación rápida de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) en una muestra de prueba usando espectrometría de masas. Los métodos rápidos permiten la caracterización y/o identificación de bacterias acidorresistentes más rápidamente que técnicas previas, dando como resultado diagnósticos más rápidos y caracterización/identificación de muestras de prueba. Las etapas implicadas en los métodos de la invención, desde la obtención de una muestra a la caracterización/identificación de bacterias acidorresistentes, pueden llevarse a cabo en una base de tiempo muy corta para obtener información susceptible de tratamiento clínicamente relevante. En algunas disposiciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo en menos de aproximadamente 120 minutos, por ejemplo, en menos de aproximadamente 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15 o 10 minutos. La rapidez de los métodos de la invención representa una mejora sobre los métodos previos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para inactivación de bacterias acidorresistentes contenidas o que se sospecha que están contenidas en una muestra o muestra de prueba.

En un ejemplo, se obtienen muestras de un individuo (por ejemplo, un paciente) que tiene o que se sospecha que tiene una infección bacteria acidorresistente. Como se usa en la presente memoria, el término «bacteria acidorresistente» incluye cualquier bacteria acidorresistente conocida, incluyendo, pero no limitado a, micobacterias y *Actinomyces* (incluyendo *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsakamurella* y *Dietzia*).

Como se usa en la presente memoria, el término "micobacterias" o "*Mycobacterium*" incluye cualquier micobacteria conocida, incluyendo, pero no limitado a, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium goodii*.

Como se usa en la presente memoria, el término "nocardia" o "*Nocardia*" incluye cualquier nocardia conocida, incluyendo, pero no limitado a, *Nocardia aerocolonigenes*, *Nocardia africana*, *Nocardia argentinensis*, *Nocardia*

asteroids, *Nocardia blackwellii*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia brevicatena*, *Nocardia camea*, *Nocardia caviae*, *Nocardia cerradoensis*, *Nocardia corallina*, *Nocardia cyriacigeorgica*, *Nocardia dassonvillei*, *Nocardia elegans*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia nigritans*, *Nocardia nova*, *Nocardia opaca*, *Nocardia otitidis-cavarium*, *Nocardia paucivorans*, *Nocardia pseudobrasiliensis*, *Nocardia rubra*, *Nocardia seriolae*, *Nocardia transvelencesis*, *Nocardia uniformis*, *Nocardia vaccinii* y *Nocardia veterana*.

Como se usa en la presente memoria, «caracterización» incluye la categorización o clasificación amplia de partículas biológicas y/o la identificación real de un solo género o una sola especie de una bacteria acidorresistente. La clasificación puede comprender la determinación de características fenotípicas y/o morfológicas para las bacterias acidorresistentes. Por ejemplo, la caracterización de las bacterias puede llevarse a cabo basándose en diferencias observables tales como composición, forma, tamaño, pigmentación, agrupación y/o metabolismo.

Como se usa en la presente memoria «identificación» significa determinar a qué familia, género, especie y/o cepa pertenece una bacteria acidorresistente previamente desconocida (por ejemplo, micobacterias o nocardias). Por ejemplo, identificar una bacteria acidorresistente previamente desconocida a nivel de familia, género, especie y/o cepa.

En una realización, el método comprende las siguientes etapas secuenciales: (a) adquirir una muestra de prueba de un medio de cultivo sólido o semisólido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) y suspender la muestra de prueba en un recipiente que contiene etanol y perlas; (b) tratar mediante un homogeneizador tipo *beadbeater* y/o someter a agitación vorticial el recipiente para romper los pequeños agregados y/o romper células de bacterias acidorresistentes en el recipiente e (c) incubar con posterioridad la suspensión durante al menos 10 minutos para inactivar las bacterias acidorresistentes contenidas en la muestra de prueba. Típicamente, la muestra de prueba de bacterias acidorresistentes puede adquirirse de cualquier forma conocida, por ejemplo, la muestra de prueba de bacterias acidorresistentes puede adquirirse, o tomarse, del medio de cultivo sólido o semisólido usando un asa bacteriológica o un hisopo.

En una configuración, el recipiente en la etapa (a) puede contener de aproximadamente 20 µl a aproximadamente 1 ml de etanol, o de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 750 µl, de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 500 µl, o aproximadamente 500 µl de etanol. El etanol en el recipiente puede ser etanol aproximadamente al 50 % a aproximadamente al 100 %, etanol de aproximadamente al 60 % a aproximadamente al 90 %, o etanol de aproximadamente al 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

Como se describió previamente, la muestra de prueba de bacterias acidorresistentes puede someterse primero a ruptura mecánica en la etapa (b), por ejemplo, usando un homogeneizador tipo *beadbeater* (BioSpec, Bartlesville, OK), un homogeneizador que rompa las células por agitación de un vial de microcentrifuga sellado que contiene muestra, disolución de extracción y perlas. Típicamente, las perlas pueden ser cualquier perla conocida que pueda operar para romper las células en un recipiente o tubo de microcentrifuga. Por ejemplo, las perlas pueden ser perlas de vidrio, cerámica, circonia, silicio, metal, acero, carburo de tungsteno, granate, arena o zafiro. En una configuración, la perla puede tener un tamaño de aproximadamente 0.1 mm a aproximadamente 1 mm, por ejemplo, de tamaño aproximadamente 0.5 mm. En una configuración, las perlas son perlas de vidrio de 0.5 mm. Típicamente, se somete a ruptura el recipiente por tratamiento en un molino y/o sometiendo a agitación vorticial el recipiente en la etapa (b) durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos, durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, o durante aproximadamente 5 minutos o 10 minutos.

Después de que se hayan roto las bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba, el recipiente, y así, las bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba se someten a inactivación por incubación del recipiente durante al menos 3 minutos. En una configuración, la etapa (c) de incubación puede ser durante al menos 5 minutos o al menos 10 minutos. En otra configuración, la etapa (c) de incubación puede ser durante aproximadamente 3 minutos a aproximadamente 30 minutos, durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 15 minutos, o durante aproximadamente 5, 10, 15, 20 o 30 minutos. En una realización, la etapa (c) de incubación es a temperatura ambiente.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para inactivación de bacterias acidorresistentes contenidas o que se sospecha que están contenidas en un medio de cultivo líquido.

En una realización, el método comprende las siguientes etapas secuenciales: (a) adquirir una muestra de prueba de un medio de cultivo líquido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) y añadir la muestra de prueba a un recipiente; (b) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba y retirar con posterioridad el sobrenadante; (c) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en etanol y añadir con posterioridad perlas al recipiente; (d) tratar mediante un homogeneizador tipo *beadbeater* y/o someter a agitación vorticial el recipiente para separar los pequeños agregados y/o romper las células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente e (c) incubar con posterioridad la suspensión durante al menos 10 minutos para inactivar las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) contenidas en la muestra de prueba. En una configuración, la muestra de cultivo líquida adquirida puede ser de aproximadamente 0.5 ml a aproximadamente 10 ml, de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 3 ml, o aproximadamente 1, 2, 3 o 5 mililitros.

Después de la etapa (b) de centrifugación, puede resuspenderse el sedimento de bacterias acidorresistentes en la etapa (c) en el recipiente con desde aproximadamente 10 µl a aproximadamente 1 ml de etanol, o con aproximadamente 50 µl a aproximadamente 750 µl, con aproximadamente 100 µl a aproximadamente 500 µl, o con aproximadamente 500 µl. El etanol usado para resuspender el sedimento puede ser etanol de aproximadamente al 50 % a aproximadamente al 100 %, etanol de aproximadamente al 60 % a aproximadamente al 90 %, o etanol aproximadamente al 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

Como se describió previamente, las muestras de prueba de bacterias acidorresistentes pueden someterse primero a ruptura mecánica en la etapa (d), por ejemplo, usando un homogeneizador tipo *beadbeater* (BioSpec, Bartlesville, OK), un homogeneizador que rompa las células por agitación de un vial de microcentrifuga sellado que contenga muestra, disolución de extracción y perlas. Típicamente, las perlas pueden ser perlas conocidas cualesquiera que puedan operar para romper las células en un recipiente o tubo de microcentrifuga. Por ejemplo, las perlas pueden ser perlas de vidrio, cerámica, circonia, silicio, metal, acero, carburo de tungsteno, granate, arena o zafiro. En una configuración, la perla puede tener de aproximadamente 0.1 mm a aproximadamente 1 mm de tamaño, por ejemplo, aproximadamente 0.5 mm de tamaño. En una configuración, las perlas son perlas de vidrio de 0.5 mm. Típicamente, se somete el recipiente a ruptura tratando en un molino o sometiendo a agitación vorticial el recipiente en la etapa (d) durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos, durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, o durante aproximadamente 5 minutos o 10 minutos.

Después de que se han roto las bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba, se somete el recipiente, y así, las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) en la muestra de prueba, a inactivación por incubación del recipiente durante al menos 3 minutos. En una configuración, la etapa (c) de incubación puede ser durante al menos 5 minutos o durante al menos 10 minutos. En otra configuración, la etapa (c) de incubación puede ser durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, o durante aproximadamente 5, 10, 15, 20 o 30 minutos. En una realización, la etapa (e) de incubación es a temperatura ambiente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a más etapas para extracción de una muestra de prueba de bacterias acidorresistentes. En una realización, la muestra de prueba de bacterias acidorresistentes sometida a las etapas de extracción de la presente invención puede ser la muestra de prueba obtenida de los métodos descritos previamente para inactivación (es decir, las muestras de prueba de las bacterias acidorresistentes inactivadas descritas anteriormente).

El método de extracción puede comprender las siguientes etapas: centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes inactivadas (por ejemplo, micobacterias o nocardias) y retirar, con posterioridad, el sobrenadante; resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en ácido fórmico y añadir con posterioridad acetonitrilo al recipiente .

Por ejemplo, en una realización, puede usarse el método de extracción siguiendo el método ya descrito para inactivación de una muestra de prueba de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) adquirida de un medio de cultivo sólido o semisólido. Según esta realización, el método puede comprender además las siguientes etapas secuenciales adicionales: (d) centrifugar el recipiente para sedimentar la muestra de bacterias acidorresistentes y retirar el sobrenadante; (e) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en ácido fórmico y (f) añadir con posterioridad acetonitrilo al recipiente. Opcionalmente, el método comprende además la centrifugación de la muestra de prueba en el recipiente después de la etapa (f).

En otra realización, puede usarse el método de extracción siguiendo el método ya descrito para inactivación de una muestra de ensayo de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) adquirida de un medio de cultivo líquido. Según esta realización, el método puede comprender además las siguientes etapas adicionales: (f) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes inactivadas y retirar con posterioridad el sobrenadante; (g) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en ácido fórmico y (h) añadir con posterioridad acetonitrilo al recipiente .

Puede resuspenderse el sedimento usando de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 % de ácido fórmico, de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 90 % de ácido fórmico, o aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de ácido fórmico. Después de resuspender el sedimento, se añade acetonitrilo para obtener una concentración final de desde aproximadamente un 35 % a aproximadamente un 65 %, para obtener una concentración final de desde aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 60 %, o para obtener una concentración final de aproximadamente un 35 %, 40 %, 50 %, 60 % o 65 % de acetonitrilo. Típicamente, se usa acetonitrilo al 100 % para este etapa.

En una configuración, puede resuspenderse el sedimento en al menos aproximadamente 3 µl, 5 µl o 10 µl de ácido fórmico (en la etapa (e) (a partir de una muestra de prueba adquirida de un medio sólido o semisólido) o en la etapa (g) (a partir de una muestra de prueba líquida)) y pueden añadirse al menos 3 µl, 5 µl o 10 µl de acetonitrilo al sedimento resuspendido. En otra realización, puede resuspenderse el sedimento usando de aproximadamente 3 µl a aproximadamente 100 µl de ácido fórmico, de aproximadamente 5 µl a aproximadamente 80 µl de ácido fórmico, de

aproximadamente 10 µl a aproximadamente 50 µl de ácido fórmico o de aproximadamente 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 microlitros de ácido fórmico. En otra disposición, después de resuspender el sedimento, se añaden al menos aproximadamente 3 µl, 5 µl o 10 µl de acetonitrilo al sedimento resuspendido. Por ejemplo, pueden añadirse de aproximadamente 3 µl a aproximadamente 100 µl de acetonitrilo, de aproximadamente 5 µl a aproximadamente 80 µl de acetonitrilo, de 10 µl a aproximadamente 50 µl de acetonitrilo o de aproximadamente 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 microlitros de acetonitrilo, a la muestra resuspendida.

La presente invención también proporciona métodos para la caracterización y/o identificación de bacterias acidorresistentes desconocidas (por ejemplo, micobacterias o nocardias) usando espectrometría de masas, por ejemplo, usando analizador de tiempo de vuelo y desorción/ionización láser asistida por matriz (espectrometría de masas MALDI-TOF). Según la presente invención, las etapas de caracterización y/o identificación pueden seguir a las etapas de inactivación y extracción ya descritas.

Según esta realización, los métodos pueden comprender además las siguientes etapas secuenciales adicionales: transferir una alícuota del sobrenadante de la etapa (f) (por ejemplo, para la preparación de la muestra de un medio sólido o semisólido), de la etapa (h) (por ejemplo, para la preparación de la muestra de un medio de cultivo líquido), a una lámina de objetivo para espectrometría de masas y añadir una disolución de matriz al sobrenadante y examinar la muestra de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba por comparación de uno o más espectros de masas medidos con uno o más espectros de masas de referencia. Opcionalmente, la alícuota transferida puede ser de aproximadamente 0.5 µl a aproximadamente 2.5 µl o aproximadamente 1 µl. Como se conoce en la técnica, se permite típicamente que se seque la alícuota y con posterioridad se añade una disolución de matriz. En general, puede usarse cualquier matriz conocida en la técnica. Por ejemplo, en una realización, la matriz es ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA). Según la presente invención, las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) pueden identificarse a nivel de familia, género, especie y/o cepa usando, por ejemplo, espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe a continuación además.

Después de que se haya preparado la placa o lámina para espectrometría de masas, se inserta la lámina o placa en el espectrómetro de masas. Después del tiempo requerido para evacuar la muestra (es decir, retirar los gases atmosféricos de la muestra para que esté en un entorno de 1333 Pa - 667 Pa (10 torr - 5 torr) a 1333 Pa - 933 Pa (10 torr - 7 torr), se introduce la muestra en la cámara de ionización del espectrómetro de masas. Se alinea la muestra con el sistema. Cuando se consigue la alineación óptima, se pulsa el láser de nitrógeno. La absorción de la energía láser por la matriz hace que se extraiga de la superficie de la placa debido a la alta energía depositada. Como efecto secundario, también se vaporizan porciones de las células de las bacterias acidorresistentes y se ionizan en el procedimiento. Estos iones se aceleran para una energía cinética conocida por la generación de un campo electrostático entre la placa y la entrada al tubo de vuelo del espectrómetro de masas (es decir, esta porción del sistema es el discriminador de masa/carga). Todos los iones cargados por separado, sin tener en cuenta la masa, tendrán la misma energía cinética a la entrada del tubo de vuelo, pero tendrán velocidades que serán inversamente proporcionales a sus masas. Desde ahí, los iones bajarán por el tubo de vuelo hacia el detector y los iones más ligeros llegarán antes que los iones más pesados (el tubo de vuelo es el discriminador de masa/carga). El detector genera una carga eléctrica cada vez que un ion impacta en el detector. Se digitaliza la salida del detector y la salida muestra la relación masa/carga en un eje y el número de impactos en el otro. En una realización, se pueden examinar las bacterias acidorresistentes en la lámina o placa usando cualquier técnica de espectrometría de masas conocida, tal como espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas con ionización por desorción con electroespray (DESI), espectrometría de masas con cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas con cromatografía líquida (LC), espectrometría de masas con ionización por electroespray (ESI) y espectrometría con tubo de selección de iones con flujo (SIFT) (todas por sus siglas en inglés) u otra técnica de espectrometría de masas conocida.

Según la invención, se toman mediciones de control para bacterias acidorresistentes conocidas, permitiendo así la correlación de los datos de ensayo medidos con la caracterización de las bacterias acidorresistentes de interés usando varios métodos matemáticos conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden compararse los datos de las muestras con valores de referencia o mediciones de control utilizando sistemas de programas informáticos conocidos para un experto en la materia. Más en particular, pueden analizarse los datos por una serie de métodos de análisis multivariado tales como, por ejemplo, el análisis discriminante generalizado (GDA), análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLSDA), regresión de mínimos cuadrados parciales, análisis de componentes principales (PCA), análisis paralelo de factores (PARAFAC), análisis de redes neuronales (NNA) y/o máquina de vectores soporte (SVM) (todas por sus siglas en inglés). Se pueden usar estos métodos para clasificar bacterias acidorresistentes desconocidas (por ejemplo, micobacterias o nocardias) de interés en grupos relevantes basándose en nomenclatura existente y/o en grupos que se encuentran en la naturaleza basándose en el metabolismo, la patogenicidad y/o la virulencia del organismo en el diseño del sistema para control, detección y/o caracterización del organismo como se describió previamente. En una realización, después de la adquisición de uno o más espectros de masas para bacterias acidorresistentes, esos espectros de masas pueden ser entrada en el programa informático de identificación de microorganismos «Saramis» (bioMérieux, Inc., St. Louis, MO) para análisis, y así, para caracterización y/o identificación de las bacterias acidorresistentes.

En otra realización más, pueden usarse mediciones no espectroscópicas del sistema de detección, tales como tiempos

de detección y velocidades de crecimiento para ayudar en la caracterización y/o identificación de las bacterias acidorresistentes de la muestra de prueba.

5 En algunas realizaciones de la invención, la caracterización y/o identificación de las bacterias acidorresistentes de la muestra de prueba no requieren la identificación de una especie exacta. La caracterización puede incluir la categorización o clasificación amplia de partículas biológicas así como la identificación real de una sola especie. Como se usa en la presente memoria «identificación» significa determinar a qué familia, género, especie y/o cepa pertenece una bacteria acidorresistente previamente desconocida. Por ejemplo, la identificación de una bacteria acidorresistente previamente desconocida a nivel de familia, género, especie y/o cepa.

10 En otro aspecto más, como se muestra en la figura 1, la presente invención también se refiere a un método para inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) en una muestra de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas: (a) adquirir una muestra de prueba de un medio de cultivo sólido o semisólido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes y suspender la muestra de prueba en un recipiente que contiene etanol al 70 % y perlas de vidrio de 0.5 mm; (b) tratar mediante un homogeneizador tipo *beadbeater* y/o someter a agitación vorticial el recipiente durante al menos 5 minutos para
15 separar los pequeños agregados y/o romper células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente; (c) incubar con posterioridad la suspensión durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente para inactivar toda bacteria acidorresistente contenida en la muestra de prueba; (d) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes y retirar el sobrenadante; (e) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en 10 µl con ácido fórmico; (f) añadir 10 µl de acetonitrilo al recipiente; (g) transferir una alícuota de 1 µl del sobrenadante de la
20 etapa (f) a una lámina de objetivo para espectrometría de masas y añadir 1 µl de disolución de matriz al sobrenadante y (h) examinar la muestra de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes por comparación de esos espectros de masas medidos con espectros de masas de referencia. Según la presente invención, las bacterias acidorresistentes (por ejemplo, micobacterias o nocardias) pueden identificarse a nivel de
25 familia, género, especie y/o cepa.

En otro aspecto más, como se muestra en la figura 2, la presente invención también se refiere a un método para inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes en una muestra de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas: (a) adquirir una muestra de prueba de 2 ml de un medio de cultivo líquido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes y añadir la muestra de prueba a un recipiente, centrifugar el
30 recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba y retirar con posterioridad el sobrenadante; (b) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en 500 µl de etanol al 70 %; (c) añadir con posterioridad perlas de vidrio de 0.5 mm al recipiente; (d) tratar mediante un homogeneizador tipo *beadbeater* el recipiente durante al menos 5 minutos para separar los pequeños agregados y/o romper las células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente; (e) incubar con posterioridad la suspensión durante al menos 10 minutos a
35 temperatura ambiente para inactivar las bacterias acidorresistentes contenidas en la muestra de prueba; (f) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes inactivadas y retirar con posterioridad el sobrenadante; (g) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en 10 µl de ácido fórmico; (h) añadir con posterioridad 10 µl de acetonitrilo al recipiente; (i) transferir una alícuota de 1 µl del sobrenadante de la etapa (h) a una lámina de objetivo para espectrometría de masas y añadir 1 µl de disolución de matriz al sobrenadante y (j) examinar la muestra
40 de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes por comparación de uno o más espectros de masas medidos con espectros de masas de referencia. Según la presente invención, las bacterias acidorresistentes pueden identificarse a nivel de familia, género, especie y/o cepa.

REIVINDICACIONES

1. Un método para inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes en una muestra de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas secuenciales:
 - 5 (a) adquirir una muestra de prueba de un medio de cultivo sólido o semisólido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes y suspender la muestra de prueba en un recipiente que contiene etanol y perlas;
 - (b) tratar mediante un homogeneizador tipo *beadbeater* el recipiente para separar los pequeños agregados y/o romper las células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente;
 - (c) incubar con posterioridad la suspensión durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente para inactivar las bacterias acidorresistentes contenidas en la muestra de prueba;
 - 10 (d) centrifugar el recipiente para sedimentar la muestra de bacterias acidorresistentes y retirar el sobrenadante;
 - (c) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en ácido fórmico y
 - (f) añadir con posterioridad acetonitrilo al recipiente;

en donde el ácido fórmico y el acetonitrilo extraen y disuelven las proteínas celulares de las células inactivadas.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende además las siguientes etapas secuenciales adicionales:
 - (g) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes inactivadas de la etapa (f) y transferir con posterioridad una alícuota del sobrenadante a una lámina o placa de objetivo para espectrometría de masas y añadir una disolución de matriz al sobrenadante y
 - 20 (h) examinar la muestra de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba por comparación de uno o más espectros de masas medidos con uno o más espectros de masas de referencia.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde se aplica el sobrenadante de la etapa (d) directamente, o como una suspensión acuosa, a una lámina o placa para espectrometría de masas.
- 25 4. El método según las reivindicaciones 2 o 3, en donde la etapa (g) comprende transferir una alícuota de la muestra de prueba a una lámina o placa para espectrometría de masas, permitir que se seque la alícuota y añadir con posterioridad una matriz y/o en donde dicha matriz es ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA).
5. Un método para inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes en una muestra de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas secuenciales:
 - 30 (a) adquirir una muestra de prueba de un medio de cultivo sólido o semisólido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes y suspender la muestra de prueba en un recipiente que contiene etanol al 70 % y perlas de vidrio de 0.5 mm:
 - (b) tratar mediante un homogeneizador tipo *beadbeater* el recipiente para separar los pequeños agregados y/o romper las células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente ;
 - 35 (c) incubar con posterioridad la suspensión durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente para inactivar las bacterias acidorresistentes contenidas en la muestra de prueba;
 - (d) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes y retirar el sobrenadante;
 - (c) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en al menos 3 µl con ácido fórmico;
 - (f) añadir al menos 3 µl de acetonitrilo al recipiente, en donde el ácido fórmico y el acetonitrilo extraen y disuelven las proteínas celulares de las células inactivadas;
 - 40 (g) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes inactivadas de la etapa (f) y transferir con posterioridad una alícuota del sobrenadante a una lámina o placa de objetivo para espectrometría de masas y añadir una disolución de matriz al sobrenadante y
 - (h) examinar la muestra de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes por comparación del espectro de masas medido con uno o más espectros de masas de referencia.
 - 45 6. Un método para inactivación y extracción de bacterias acidorresistentes en una muestra de prueba, comprendiendo

el método las siguientes etapas secuenciales:

- (a) adquirir una muestra de prueba de un medio de cultivo líquido que se sabe que contiene o que puede contener bacterias acidorresistentes y añadir la muestra de prueba a un recipiente, centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba y retirar con posterioridad el sobrenadante;
- 5 (b) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en etanol;
- (c) añadir perlas de vidrio al recipiente;
- (d) tratar mediante un homogeneizador tipo *beadbeater* el recipiente para separar los pequeños agregados y/o romper las células de las bacterias acidorresistentes en el recipiente;
- 10 (e) incubar con posterioridad la suspensión durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente para inactivar las bacterias acidorresistentes contenidas en la muestra de prueba;
- (f) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes inactivadas y retirar con posterioridad el sobrenadante;
- (g) resuspender el sedimento de bacterias acidorresistentes en ácido fórmico y
- 15 (h) añadir con posterioridad acetonitrilo al recipiente, en donde el ácido fórmico y el acetonitrilo extraen y disuelven las proteínas celulares de las células inactivadas;
- (i) centrifugar el recipiente para sedimentar las bacterias acidorresistentes inactivadas de la etapa (h) y transferir con posterioridad una alícuota del sobrenadante a una lámina o placa de objetivo para espectrometría de masas y añadir una disolución de matriz al sobrenadante y
- 20 (j) examinar la muestra de prueba en la lámina o placa por espectrometría de masas para adquirir uno o más espectros de masas de las bacterias acidorresistentes y caracterizar y/o identificar dichas bacterias acidorresistentes en la muestra de prueba por comparación de uno o más espectros de masas medidos con uno o más espectros de masas de referencia.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichas bacterias acidorresistentes son micobacterias o nocardias.
- 25 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho recipiente contiene etanol al 70 % y/o en donde dichas perlas son perlas de vidrio de 0.5 mm.
9. El método según las reivindicaciones 1 a 8, en donde se resuspende el sedimento en ácido fórmico al 70 % y/o al menos 3 µl de ácido fórmico en la etapa (e) de las reivindicaciones 1 a 5 o la etapa (g) de la reivindicación 6.
- 30 10. El método según las reivindicaciones 1 a 9, en donde se añade acetonitrilo en una concentración final de desde un 35 % a un 65 % y/o en donde se añaden al menos 3 µl de acetonitrilo en la etapa (f) de las reivindicaciones 1 a 5 o la etapa (h) de la reivindicación 6.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método comprende además tratar mediante un homogeneizador tipo *beadbeater* el recipiente en la etapa (b) de las reivindicaciones 1 a 5 o la etapa (d) de la reivindicación 6 durante de 1 minuto a 30 minutos.
- 35 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se identifica dicha muestra de bacterias acidorresistentes a nivel de familia, género, especie y/o cepa.

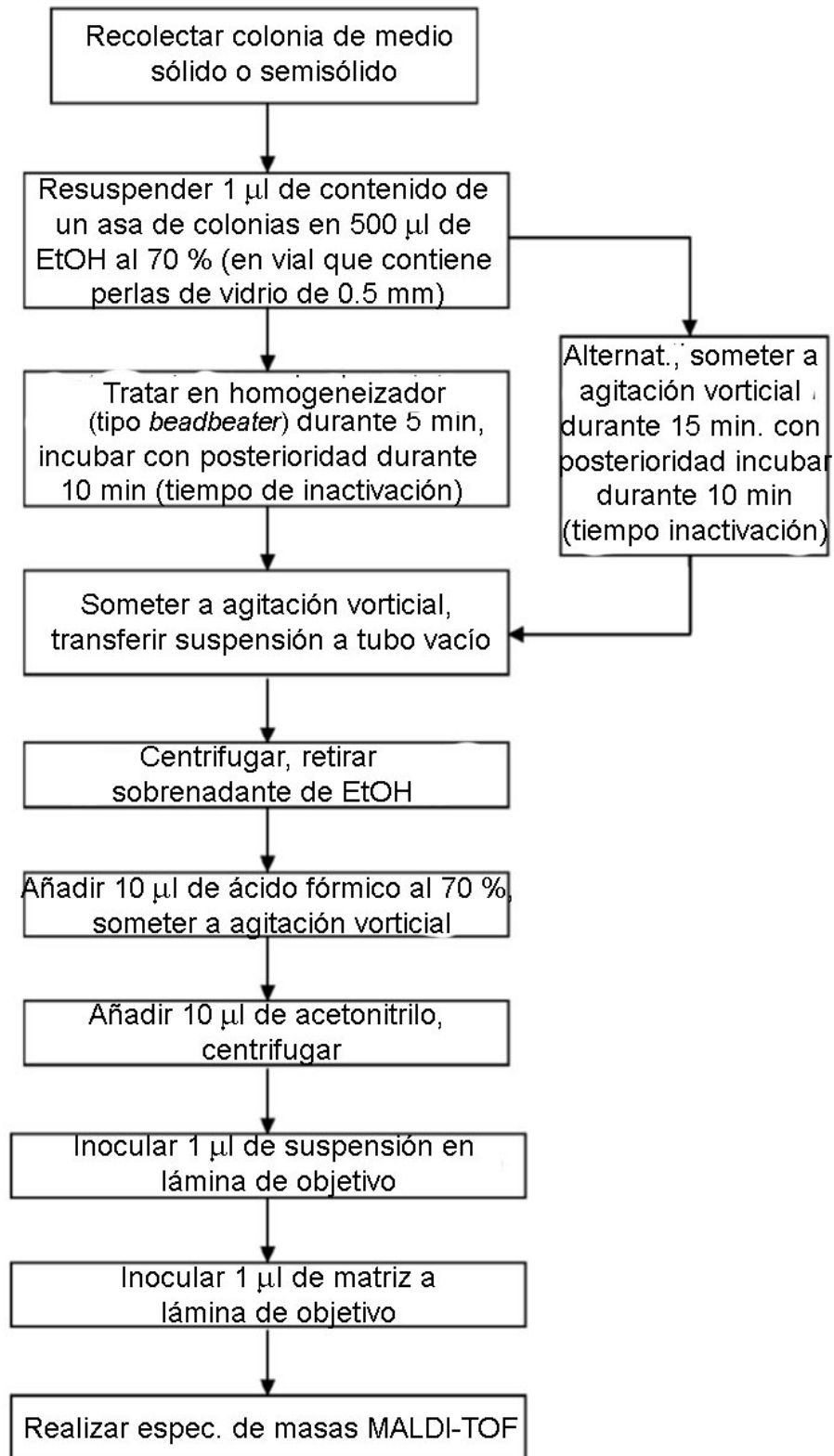
Figura 1. Inactivación/extracción de medios sólidos

Figura 2. Inactivación/extracción de medios líquidos