

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 687**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2013 PCT/US2013/035263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2013 E 13878493 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2971050**

54 Título: **Un método para mejorar el análisis de microorganismos en matrices complejas**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361779766 P

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

05.06.2019

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**LI, XIAO;
KOPHER, KENNETH, ANTHONY;
MANTLO, JOHN, D.;
POPE, WILLIAM, ALFRED;
SHI, SONG y
YUP, AXEL, A.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 715 687 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

Un método para mejorar el análisis de microorganismos en matrices complejas

Antecedentes de la invención.

5 La determinación de la identidad y del número total de organismos viables en una muestra particular es de una importancia tremenda. De importancia específica es la monitorización y la confirmación de la seguridad de los suministros de alimentos y agua a través de la vigilancia e identificación de organismos patógenos en los alimentos y en el medio ambiente de una manera rápida, eficiente y precisa.

10 Un método así para lograr esto es el ensayo del organismo de viabilidad total (Total Viability Organism: TVO). El ensayo de TVO se usa ampliamente hoy en día como una aplicación de control de calidad en el campo de la microbiología industrial. El ensayo de TVO se utiliza, por ejemplo, para monitorizar el número y los tipos de bacterias en los productos alimenticios de consumo, como la carne. El método TVO también se puede utilizar para monitorizar las poblaciones de bacterias en el agua potable. La monitorización de los alimentos y del agua es, por supuesto, necesaria para garantizar que el suministro de alimentos y agua es seguro para el consumo.

15 Los pasos del ensayo de TVO generalmente incluyen: 1) obtener una muestra de prueba; y 2) cultivar o sembrar la muestra en agar (una sustancia nutriente gelatinosa), puesta en un recipiente adecuado. Se dejan crecer los organismos microbianos y se calculan las unidades formadoras de colonias (CFU) en función del número de colonias que se forman en el agar. Las CFU pueden calcularse tan solo después de dejar tiempo para que se prolongue el crecimiento de la colonia. Típicamente las muestras se diluyen y este factor de dilución (es decir, la relación del volumen de la muestra respecto al volumen total) se tiene en cuenta al calcular las CFU.

20 Las muestras se pueden cultivar también en diversas placas de agar que contienen diferentes tipos de medios selectivos para ayudar a aislar los microorganismos objetivo y determinar de manera más precisa y confiable qué tipos de microorganismos están presentes. Los agentes selectivos (por ejemplo, antibióticos, agentes antifúngicos, etc.) eliminarán ciertos microorganismos no objetivo (por ejemplo, bacterias sin interés). Esto evita la posibilidad de resultados espurios que podrían presentarse si se forman colonias de muchos tipos diferentes de microorganismos.

25 Los agentes selectivos también pueden favorecer el crecimiento de ciertos tipos de microorganismos sobre otros. Aunque el ensayo de TVO permite la detección de diferentes especies de microorganismos, p. ej. diferentes especies bacterianas, los microbiólogos alimentarios y medioambientales deben elegir a menudo entre enumeración e identificación sin la opción de ambas. Aunque se pueden agregar agentes selectivos para favorecer el crecimiento de un grupo específico de organismos, el ensayo de TVO suele basarse en la capacidad de las células sanas normales para multiplicarse en un medio rico en nutrientes (es decir, sin selección). Por tanto el TVO tiene la capacidad de medir el número total de microorganismos o un grupo de microorganismos en la muestra analizada. Sin embargo, debido a la falta de capacidad para diferenciar microorganismos específicos, el TVO puede ser relativamente inespecífico para la población de microorganismos en su conjunto.

35 Hay otros muchos métodos disponibles que identifican microorganismos específicos, especialmente patógenos. Tales métodos son ampliamente utilizados en el marco clínico. Los métodos para detectar microorganismos dependen a menudo del enriquecimiento del cultivo de microorganismos con el fin de aumentar el número de microorganismos objetivo y permitir la reanimación de los microorganismos dañados. Cuando se emplea siembra en medio selectivo y diferencial, los investigadores pueden discriminar el organismo objetivo de la microflora de fondo. Sin embargo, los resultados son casi siempre no enumerables. En otras palabras, solo se puede determinar la presencia o ausencia de una población bacteriana particular, no la cantidad.

40 La utilización de los resultados tanto del enriquecimiento de la muestra como de la siembra en medio selectivo es un ensayo que requiere mucho tiempo, que a menudo lleva varios días, incluso antes de que se pueda obtener un resultado preliminar. Aunque dicho enriquecimiento y siembra en medio selectivo es un procedimiento básico para determinar el número y los tipos de microorganismos en una muestra, la obtención de un resultado final puede llevar típicamente varios días después de contar las colonias cultivadas en agar. El mucho tiempo que se necesita para obtener resultados es el inconveniente más importante del uso del ensayo básico de TVO.

45 Se han desarrollado diferentes métodos que intentan acortar el tiempo de detección al eliminar los pasos de siembra en medio selectivo y diferencial. Tales métodos incluyen hibridación de ADN, aglutinación e inmunoensayo enzimático. Aunque estas técnicas alternativas han acortado el tiempo de detección, las etapas de enriquecimiento del cultivo siguen siendo necesarias porque estos métodos solo permiten la detección definitiva de 10^3 - 10^4 CFU del agente patógeno objetivo. Por tanto, la confirmación de resultados presuntamente positivos sigue siendo necesaria para el análisis de TVO.

55 Además, no existe un método universal o técnica única disponible para analizar una muestra biológica, especialmente una muestra de alimentos, para detectar la presencia o ausencia de múltiples microorganismos. Esto hace que los pasos de preparación de la muestra para la separación y posterior concentración de microorganismos de una muestra

biológica antes del ensayo de los microorganismos sea un paso limitante de la velocidad en los métodos moleculares para la detección de patógenos, incluidos los patógenos transmitidos por los alimentos.

5 Con respecto a las técnicas específicas de preparación de muestras para la separación de microorganismos, las técnicas que utilizan centrifugación seguida de etapas de lavado y filtración no son ventajosas porque dan lugar a una pérdida significativa o a un daño a los microorganismos durante el procesamiento. Además, el procedimiento completo no es susceptible de automatización.

10 Con el fin de lograr la separación del microorganismo de la muestra, se han empleado agentes de afinidad para un microorganismo en particular. Sin embargo, los agentes de afinidad utilizados para aislar los microorganismos de las matrices complejas son también complicados de implementar debido a: 1) la falta de agentes de afinidad universales que se unen selectivamente a todos los organismos de los otros constituyentes de la muestra; 2) la variabilidad en las afinidades de unión de diferentes organismos para los reactivos de afinidad universales; y 3) la dificultad para eluir el organismo unido de nuevo a la solución.

15 También se conocen otras técnicas para identificar patógenos en alimentos y agua. Por ejemplo, la citometría de flujo se ha publicado como una técnica rápida para enumerar e identificar microorganismos. La citometría de flujo es un método originalmente utilizado para separar y analizar poblaciones de células eucariotas, pero también se ha empleado en la evaluación y detección de microorganismos. Concretamente, los microorganismos que han sido teñidos con fluorescencia se pasan a través de un haz de luz. Un patrón único para el microorganismo de interés se logra mediante la combinación de la adsorción y la dispersión de la luz (Breeuwer et al., "Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *S. cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (4): 1614 - 9 (abril 1995); de Boer & Beumer, "Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms", *Int. J. Food. Microbiol.*, 50 (1 - 2): 119 - 30 (septiembre de 1999)).

25 La principal ventaja de la citometría de flujo es que es rápida y fácil de llevar a cabo. La citometría de flujo es adaptable a diferentes tipos de muestras y métodos, lo que hace que sea una aplicación robusta que también es susceptible de automatización. No es sorprendente que hayan surgido numerosas aplicaciones de citometría de flujo en biotecnología industrial, control de calidad farmacéutica y alimentaria, monitorización rutinaria de sistemas de agua potable y aguas residuales, e investigación microbiana ecológica en suelos y hábitats acuáticos naturales. Los resultados de la citometría de flujo se correlacionan bien con los resultados de los métodos estándar de recuento en placa. Sin embargo, la citometría de flujo tiene otras limitaciones, como la necesidad de teñir los microorganismos diana para la detección, el alto costo del equipo y la necesidad de adiestramiento del personal especializado. El uso extensivo y rutinario de esta técnica ha comenzado a mitigar estos inconvenientes.

30 Sin embargo, sigue habiendo otros problemas prácticos con la citometría de flujo, especialmente en el contexto del análisis de muestras biológicas o medioambientales derivadas de lo que se conoce como "matrices complejas". Las matrices complejas pueden consistir en sustancias que interfieren con la detección de microorganismos en la muestra biológica o medioambiental. Se imponen otros límites de detección por interferencia de fluorescencia no específica o por materia particulada, menores que los límites de detección óptimos, dificultad en la aplicación del método a muestras de alimentos sólidos o en partículas, la incapacidad de diferenciar entre células viables y células muertas a menos que se use tinción especializada, y destrucción de la viabilidad celular que puede también presentarse durante el procesamiento de la muestra (Quintero-Betancourt et al., "Cryptosporidium parvum and Cyclospora cayetanensis: a review of laboratory methods for detection of the waterborne parasites", *J. Microbiol. Methods*, 49 (3): 209 - 24 (mayo de 2002)).

35 La presencia de sustancias de interferencia o material en partículas en la muestra aumenta el ruido de fondo y complica el análisis de muestras biológicas o medioambientales utilizando citometría de flujo. Teniendo en cuenta estos inconvenientes, muchos investigadores se han mostrado reacios a explorar completamente el uso de la citometría de flujo para analizar muestras, especialmente las que contienen partículas, ya que consideran que no es muy prometedor para el uso rutinario.

El documento US-A-2011/104685 describe un método basado en la citometría de flujo para el recuento preciso de organismos en un fluido de muestra en el que hay contaminantes presentes.

40 El documento US-A-2010/129813 describe un método de detección de microorganismos patógenos o parásitos en una muestra, en el que la muestra se trata con carbón vegetal recubierto con bentonita con el fin de eliminar inhibidores de la PCR y a continuación el ADN es aislado y analizado.

45 Debido a las estructuras de la pared celular y las propiedades de permeación de los colorantes fluorescentes, a veces se requieren en la solución de tinción agentes como el EDTA para desestabilizar la membrana externa de las células de bacterias gram negativas y aumentar la absorción de colorante. Las intensidades de tinción de algunas bacterias gram negativas en matrices complejas, tales como el extracto de carne molida, no son tan altas como la intensidad de tinción de las bacterias en un tampón, o tampón que contiene una cantidad baja de matrices complejas, y la adición de EDTA no es capaz de afrontar el problema de la baja intensidad de tinción con este tipo de muestras. Como

resultado, la población teñida de ciertos organismos está muy cerca del fondo y la relación de baja señal / fondo tendrá finalmente un impacto en la precisión y la sensibilidad del recuento.

En consecuencia, se buscan métodos que resuelvan los inconvenientes de los métodos actuales para detectar la presencia o ausencia de microorganismos en una muestra que utiliza citometría de flujo.

5 Sumario de la invención.

La presente invención se define por las reivindicaciones. Las reivindicaciones se refieren a métodos de identificación de la presencia o ausencia de al menos un microorganismo en una muestra. Como se describe en el presente documento, se obtiene en primer lugar una muestra biológica o medioambiental para analizar la presencia o ausencia de al menos un microorganismo, y luego se prepara para el ensayo. La muestra preparada se combina con una resina, después de lo cual la resina se elimina de la muestra. La muestra preparada se combina después con marcadores para el objetivo de ensayo, después de lo cual se analiza la muestra para determinar la presencia o ausencia del objetivo de ensayo.

En una realización de la invención, la muestra a analizar se obtiene de una muestra biológica o medioambiental que es o contiene una matriz compleja. Las matrices complejas se encuentran en diversas muestras que incluyen, entre otras cosas, productos alimenticios, cosméticos y muestras del suelo. La muestra a analizar puede prepararse usando técnicas conocidas para ese tipo particular de muestra biológica o medioambiental antes de la introducción de la resina, y bien conocidas por los expertos en la técnica.

Las resinas se usan para modular o reducir la interferencia de las matrices complejas con análisis de ensayo de muestras corriente abajo. Se conocen en la técnica varias resinas y la selección de una resina o resinas particulares dependerá de la naturaleza de la muestra biológica o medioambiental a analizar. La resina se elimina antes de realizar el ensayo mediante técnicas como la filtración, pero la técnica particular empleada es en gran medida una cuestión de elección de diseño y depende del tipo de resina y de la preparación de la muestra. El profesional experto seleccionará una técnica de separación adecuada basada en estos y otros factores.

La muestra, después del tratamiento con resina y la eliminación de la resina, se analiza utilizando un citómetro de flujo. Un colorante apropiado, tal como un colorante de ácido nucleico u otro colorante fluorescente, se combina con la muestra después de la eliminación de la resina y antes de la citometría de flujo. El colorante facilita la detección del objetivo de ensayo en el citómetro de flujo. También se pueden emplear técnicas de mejora, como el apagado, para mejorar aún más la integridad del ensayo.

Breve descripción de los dibujos.

La fig. 1 ilustra los pasos de una realización del método descrito en el presente texto para detectar bacterias en una muestra biológica utilizando citometría de flujo.

La fig. 2 presenta una serie de gráficos de puntos generados durante el análisis de citometría de flujo para detectar la presencia o ausencia de *E. coli* en una muestra biológica que compara los resultados de muestras tratadas con resina con muestras no tratadas con resina.

La fig. 3 presenta una serie de gráficos de puntos generados durante el análisis de citometría de flujo para detectar la presencia o ausencia de *P. aeruginosa* en una muestra biológica que compara los resultados para muestras tratadas con resina con muestras no tratadas con resina.

La fig. 4 presenta una serie de gráficos de puntos generados durante el análisis de citometría de flujo para determinar la cantidad de bacterias en la carne de res molida y comparando los resultados con los resultados obtenidos de un ensayo de TVO.

Descripción detallada.

La determinación precisa de bacterias vivas, muertas y totales es importante en muchas aplicaciones de microbiología. Para metodologías basadas en cultivos, se requieren microorganismos viables que formen colonias en un medio de crecimiento sólido y proliferen en caldos de nutrientes líquidos. Estas pruebas tradicionales, basadas en el cultivo, requieren mucho tiempo y pueden funcionar mal con microorganismos viables que son de crecimiento lento o no cultivables. Como tales, estas pruebas tradicionales basadas en el cultivo no proporcionan resultados en tiempo real ni información puntual que se necesita en aplicaciones tales como la monitorización de alimentos y agua relacionada con la salud para detectar la presencia de patógenos.

En el presente documento se describen métodos para mejorar los ensayos conocidos, como el ensayo de TVO, mediante el despliegue de citometría de flujo para muestras biológicas obtenidas de matrices complejas. Las muestras biológicas obtenidas de matrices complejas o que las contienen, como productos alimenticios, cosméticos y muestras de suelo, pueden ser difíciles de analizar con precisión mediante citometría de flujo debido a la interferencia causada

por las partículas de la matriz compleja. Más específicamente, las matrices complejas dificultan la detección óptica de los microorganismos objetivo en la muestra, porque sigue siendo difícil diferenciar los microorganismos objetivo de los otros constituyentes de la muestra.

5 Específicamente, los métodos descritos en este documento separan los microorganismos de una muestra de otros constituyentes de la muestra que se describen comúnmente como matrices complejas (por ejemplo, carne molida, huevos, leche, tierra, cosméticos, etc.) y mejoran la calidad de la muestra antes de someter la muestra sospechosa de que contienen microorganismos diana, a pruebas o ensayos para la detección de la presencia o ausencia de microorganismos diana. Las ventajas de usar los métodos descritos aquí incluyen, pero sin limitarse a ellas, facilitar la detección de múltiples cepas de microorganismos; eliminar inhibidores de ensayo asociados a la matriz; eliminar los
10 materiales en partículas de la matriz de interferencia; mejorar la fuerza o la capacidad de lectura de la señal de detección y proporcionar una reducción adecuada del tamaño de la muestra para permitir el uso de tamaños representativos de muestra de alimentos y/o pequeños volúmenes de medios.

Los métodos descritos en este documento ayudan a mejorar la preparación de la muestra de una manera necesaria para detectar niveles bajos de patógenos o una contaminación esporádica, lo que tal vez pueda reducir o incluso
15 eliminar la necesidad de enriquecer el cultivo de la muestra antes de la detección con el fin de acelerar el crecimiento de microorganismos.

Los métodos descritos en este documento concentran los microorganismos/patógenos/bacterias objetivo, de la muestra (si están presentes) eliminando de la muestra los inhibidores asociados a la matriz que pueden interferir con el ensayo de los microorganismos/patógenos/bacterias objetivo, al mismo tiempo que mejoran la señal detectable
20 obtenida de la muestra que es indicadora de la presencia o ausencia de los microorganismos/patógenos/bacterias objetivo. El método es ventajoso por cuanto también es universal (por ejemplo, aplicable a múltiples tipos de matrices y microorganismos/patógenos/bacterias objetivo), y es simple, rápido y económico. Además, el método descrito aquí reduce la posibilidad de resultados falsos positivos o negativos que pueden presentarse debido a la reactividad cruzada de los microorganismos/patógenos/bacterias objetivo con componentes de la matriz residual o debido a la
25 detección de células diana muertas.

Los métodos descritos en el presente documento introducen en la muestra resinas combinadas con matrices complejas para modular o reducir la interferencia de las matrices complejas con el análisis de ensayo de muestras corriente abajo. Las resinas o combinaciones de resinas adsorben los componentes de la matriz residual, y la separación de las resinas de la muestra elimina a su vez las matrices complejas de la muestra. Debe entenderse que,
30 a lo largo de esta solicitud, la adsorción por las resinas se refiere a la capacidad de las resinas para modular, o reducir, o eliminar la interferencia de detección de señales de matrices complejas sin afectar adversamente a la viabilidad de los microorganismos dentro de la matriz. Como se describe más detalladamente en este documento, los ensayos posteriores para detectar la presencia o ausencia de microorganismos/patógenos/bacterias de la muestra requieren generalmente que el objetivo sea viable para una detección confiable. El efecto físico de las resinas sobre otros
35 constituyentes de la muestra que pueden estar presentes en la matriz no es importante, siempre y cuando las resinas no tengan un impacto adverso significativo sobre la viabilidad del microorganismo objetivo.

Más en particular, las resinas que pueden usarse en la práctica de los métodos descritos en este documento incluyen adsorbentes no funcionales de resina polimérica. Las resinas tienen rebajes/superficies irregulares que se mencionan en el presente texto como poros. La resina polimérica no funcional, como se usa en este documento, es una resina polimérica que no posee restos o grupos funcionales que puedan reaccionar significativamente con los constituyentes de la muestra.
40

En otra realización, pueden usarse en la práctica de los métodos descritos resinas no funcionales tales como las resinas XAD fabricadas por Rohm & Haas, en particular resina XAD-4, que es un copolímero no funcional de estireno y divinilbenceno.

45 Debe entenderse que el tamaño de poro de la resina no es crítico para la práctica de los métodos descritos en el presente documento. En general, las resinas no tienen un tamaño de poro lo suficientemente grande como para permitir que las bacterias penetren en el interior de la resina. Sin embargo, ciertas resinas tienen estructuras macroporosas con grandes superficies internas que permiten que penetren en su interior grandes moléculas. Dichas resinas macroporosas son completamente adecuadas para su uso en la práctica de la presente invención, ya que el
50 atrapamiento de las bacterias dentro de los poros no afecta necesariamente de manera adversa a la viabilidad del microorganismo. En la medida en que las resinas macroporosas atrapan las bacterias, el experto en la técnica podrá determinar si el grado de atrapamiento afecta adversamente al análisis de la muestra corriente abajo. Las resinas que tienen poros relativamente pequeños en los que la adsorción se ve afectada principalmente en las superficies externas de la resina, es decir, las resinas microporosas, también son adecuadas en la práctica de la invención.

55 Una resina particularmente preferida es una resina absorbente polimérica no funcional, tal como XAD-4. Dicha resina elimina los componentes de la matriz de interferencia de la muestra, mientras que no afecta negativamente a la viabilidad de los microorganismos contenidos en la muestra biológica. Basándose en la orientación proporcionada en

este documento, el experto en la técnica podrá seleccionar otras resinas porosas hidrófobas adecuadas para usar en los métodos descritos en este documento.

5 Después de tratar la muestra con la resina, la resina, con matrices complejas adsorbidas sobre ella, se separa de la muestra. La separación del microorganismo objetivo de las matrices complejas antes de la tinción es ventajosa porque las intensidades de tinción de algunas bacterias gram negativas en matrices complejas, tal como el extracto de carne molida, no son tan altas como la intensidad de tinción de las bacterias en el tampón o tampón que contiene una baja cantidad de matrices complejas, y la adición de EDTA, que aumenta la absorción de colorante, no puede resolver esta cuestión.

10 La muestra se tiñe luego para que el ensayo detecte la presencia o ausencia de uno o más microorganismos objetivo en la muestra. La muestra biológica aislada, concentrada y teñida se analiza luego en relación con la presencia o ausencia de microorganismos diana utilizando citometría de flujo.

El método descrito contempla la obtención de una muestra biológica. La muestra biológica o medioambiental puede estar en forma de matriz compleja, como alimentos, suelo, cosméticos, etc. Las muestras adecuadas están en forma líquida.

15 La muestra biológica o medioambiental se prepara para el análisis, como se discutió anteriormente de manera general y en la Fig. 1. La preparación de la muestra dependerá de su naturaleza. La preparación de muestras biológicas o medioambientales para análisis es bien conocida por los expertos en la técnica y por ello no se describe con detalle en este documento. En un ejemplo de realización, la carne se mezcla primero con un tampón. El uso de un protocolo estándar para mezclar carne con el tampón adecuado para obtener el extracto de carne se considera adecuado para el uso en los métodos descritos en este documento. La mezcla se realiza utilizando una diversidad de técnicas, como añadir la muestra de carne al volumen apropiado de agua de dilución tamponada con fosfato y transferirla a una bolsa de estomacher (filtro < 50 µM - sistema Interscience Bag: 111625 o equivalente) y se mezcla en un estomacher (p. ej., Tekmar (Seward) Stomacher Lab Blender 400 o equivalente). Tales protocolos son bien conocidos por los expertos en la técnica y no se describen con detalle en el presente documento. Los ejemplos de estos protocolos se describen en el sitio web del USDA (<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microiab/mlgchp3.pdf>), que se incorpora al presente documento como referencia.

30 La cantidad apropiada de muestra preparada se transfiere luego a un recipiente estéril, como un tubo de ensayo, que contiene una resina o al que se agrega resina. El experto en la materia podrá determinar la cantidad de resina que se ha de añadir a una muestra. Se debe tener cuidado para añadir resina suficiente para eliminar los residuos de la muestra, pero que no afecte negativamente a la viabilidad de los microorganismos en la muestra para las pruebas corriente abajo. Específicamente, la muestra biológica preparada se trata/incuba con una resina que puede potencialmente unirse/ interactuar con sustancias (por ejemplo, constituyentes de las matrices complejas) que interfieren con el análisis de la muestra biológica mediante citometría de flujo.

35 En una realización, las muestras biológicas preparadas se tratan a temperatura ambiente con resina durante menos de una (1) hora. Preferiblemente, las muestras biológicas preparadas se tratan con resina durante menos de treinta (30) minutos o menos, haciendo rotar la muestra tratada con resina a 25 rpm. En otra realización, la resina es una resina adsorbente no iónica no funcional.

Después del período de tiempo prescrito, la resina se separa de la muestra biológica preparada llevando consigo matrices complejas adsorbidas por la resina.

40 En otra realización, la resina se elimina o se separa de alguna otra forma de la muestra biológica o medioambiental mediante filtración, o permitiendo que la resina se asiente y eliminando el sobrenadante del recipiente en el que se ha sedimentado la resina.

45 Después de eliminar la resina de la muestra biológica preparada, los constituyentes de la muestra restantes se combinan con un tinte para la detección del microorganismo o microorganismos objetivo. Un ejemplo de tinte es un marcador molecular. En una realización ejemplar adicional, los marcadores moleculares son colorantes o tintes fluorescentes. Tales tintes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ello, estos tintes, y la forma en la que se despliegan, no se describen con detalle en este documento. Sin embargo, se describen protocolos de tinción adecuados en la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 61/620.823 presentada el 5 de abril de 2012.

50 En otra realización, la tinción puede lograrse usando la tinción con colorante de ácido nucleico (por ejemplo, SYTO® 13 por Invitrogen). Al seleccionar un colorante, el experto considerará los siguientes factores: i) el microorganismo diana de interés (p. ej., gram positivo o gram negativo), siendo desplegado el ensayo corriente abajo para determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra; y iii) el contraste entre el tinte seleccionado y otros tintes para los constituyentes de la muestra. El experto en la materia está al tanto de otras consideraciones cuando selecciona un tinte de colorante para el método descrito en este documento.

Como se describió anteriormente, los tintes de ácidos nucleicos fluorescentes permeables a organismos vivos y muertos se usan para marcar células en suspensión para estudios de citometría de flujo. Sin embargo, la sensibilidad de detección de tales estudios de citometría de flujo puede verse afectada mientras que las células seleccionadas están en una suspensión con las partículas que se unen no específicamente a los colorantes de ácido nucleico. En el presente documento se describen varios planteamientos para eliminar y enmascarar las señales fluorescentes de las partículas que interfieren en la solución y posteriormente aumentar la sensibilidad de detección.

En una realización, la cantidad en exceso de moléculas reductoras de la señal de fondo que no permean células viables pero tienen propiedades de unión similares a los tintes de ácido nucleico, se añaden secuencial o simultáneamente con el tinte de ácido nucleico permeable a la célula, a la muestra de interés. Dado que la molécula reductora de señal de fondo no es permeable a las células viables, solo el colorante de ácido nucleico permeable a las células puede marcar las células viables y generar señales fluorescentes a partir de las células. Las partículas de interferencia que se unen no específicamente al colorante y las células muertas con membrana celular permeable se unen tanto a la tinción de ácido nucleico como a la molécula reductora de la señal de fondo que reduce la señal de fondo descrita anteriormente. La molécula reductora de la señal de fondo compite con el tinte de ácido nucleico para unirse a las partículas extracelulares y las células muertas. Como resultado, hay una intensidad reducida de la señal fluorescente causada por la unión no específica de los tintes de ácido nucleico a las partículas no diana cuando las muestras se analizan mediante citometría de flujo. La presencia de la molécula reductora de la señal de fondo reduce la intensidad de la señal de fondo causada por la unión no específica del tinte de ácido nucleico a partículas no objetivo que permanecen en la muestra después de que la resina haya extraído algunas de estas partículas de la muestra.

En otra realización, el proceso de tinción también se puede realizar junto con un protocolo de apagado. Por ejemplo, antes de completar la tinción con colorante de ácido nucleico, se puede añadir un apagador, como el amarillo de nitrazina, durante el proceso de tinción para ayudar a diferenciar la señal de detección para el microorganismo objetivo de la señal de fondo. Tal apagado de la señal hace que aumente el contraste al disminuir la intensidad de fluorescencia de la señal no deseada. Los apagadores logran esto por la absorción de la fluorescencia del colorante que de otro modo generaría señales espurias.

Los métodos descritos en el presente documento también contemplan apagar la señal de fondo descrita antes. En una realización, el dominio de unión al ácido nucleico del colorante o la molécula de colorante total está unido covalentemente a uno o más apagadores fluorescentes que no permean las células viables que pueden apagar la señal fluorescente del colorante del ácido nucleico por superposición de espectros. Dichas moléculas pueden agregarse secuencial o simultáneamente al tinte de ácido nucleico permeable a las células a la muestra de interés. Dado que la molécula no es permeable a las células viables, solo el colorante del ácido nucleico permeable a las células puede marcar las células viables y generar señales fluorescentes. Partículas no diana, tales como, por ejemplo, células muertas con membrana celular permeable y partículas de interferencia que se unen al colorante, se unen no específicamente tanto al tinte de ácido nucleico como al apagador enlazado. La molécula unida al apagador compite con los tintes de ácido nucleico con los sitios de unión en las partículas no diana. El apagador reducirá la intensidad fluorescente de las señales emitidas por los tintes de ácido nucleico unido a las partículas no objetivo (si los apagadores están lo suficientemente cerca de los tintes de ácido nucleico unidos a las partículas no objetivo).

Después se analiza la muestra biológica preparada, después de la eliminación de la resina y el marcado molecular del microorganismo viable objetivo en la muestra. El análisis se realiza utilizando un citómetro de flujo. El uso de la citometría de flujo es bien conocido por los expertos en la técnica, y no se describe en el presente documento. Una descripción del análisis de citometría de flujo se describe en Hammes, F. et al., "Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls, and applications", *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 397, pp. 1083 - 1095 (2010).

El proceso completo puede ser también automatizado. El método descrito adapta la citometría de flujo para detectar patógenos en muestras con matrices complejas.

Los ejemplos que siguen se proporcionan para ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones de la invención. Como tales, los ejemplos no son limitantes en términos de materiales, composiciones y condiciones utilizadas.

Ejemplos.

Ejemplo 1.

La Figura 1 ilustra de forma general los pasos implicados en la preparación y ensayos de muestras de carne. Estos pasos se discuten con más detalle a continuación.

Preparación de la resina.

La resina se preparó pesando 50 g de resina XAD-4 y lavándola con 100 mL de etanol desnaturalizado agitando a 240 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Después del lavado con etanol, la resina se dejó sedimentar y el etanol se decantó. La resina se suspendió después en 250 mL de agua desionizada y se puso en un agitador durante 30 minutos a 240 rpm a temperatura ambiente. La resina se dejó sedimentar después de agitar y el agua desionizada se decantó. Este proceso se repitió 3 o 4 veces.

- 5 La resina se suspendió después en 250 mL de agua desionizada y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Opcionalmente, se puede almacenar la resina a una temperatura de 2 a 8 °C hasta que se necesite.

Preparación de la muestra.

- 10 La carne molida (25 gramos) se punzó con un microorganismo de interés (por ejemplo, *E. coli* ATTC n° 25922, *S. typhimurium* ATTC n° 14028, *P. aeruginosa* ATTC n° 27853, *P. aeruginosa* ATTC n° 9027, *S. aureus* ATTC n° 25923, *S. epidermidis* ATTC n° 12228 o *L. monocytogenes* ATTC n° 13932) resultando una carga bacteriana de 1×10^6 microorganismos por gramo de carne molida.

Se añadió carne molida punzada (25 gramos) a 200 mL de tampón de fosfato pH 7,2 (BD Diagnostics Bottled Media BD-214973 o equivalente), se pasó a una bolsa de estomacher (filtro < 50 µM - sistema Interscience Bag: 111625 o equivalente) y se mezcló en un estomacher (p. ej., Tekmar (Seward) Stomacher Lab Blender 400 o equivalente) durante 2 minutos.

- 15 El líquido del estomacher se filtró a través de un filtro de 40 µm (Becton Dickinson Falcon 352340 o equivalente) para crear extracto de carne molida. Algo de extracto de carne molida se usó para el ensayo de TVO sembrando en placa de agar con el uso de técnicas conocidas. El ensayo de TVO se hizo como comparación con los resultados de citometría de flujo (véase la Fig. 4).

Tratamiento de la muestra con resina.

- 20 La resina XAD-4 preparada (5 gramos) fue transferida asépticamente a un tubo de polipropileno de 50 mL. Extractos preparados de carne molida (10 mL; punzados con *E. coli* 25922, *S. typhimurium* 14028, *P. aeruginosa* 27853, *P. aeruginosa* 9027, *S. aureus* 25923, *S. epidermidis* 12 228 o *L. monocytogenes* 13932)) se combinaron con 5 g de resina hidrofóbica XAD-4 durante 30 minutos a temperatura ambiente y se rotaron a 25 rpm. La resina se separó de la muestra dejándola sedimentar y luego removiendo o decantando el sobrenadante libre de resina en un tubo usado para tinción. Alternativamente, después de la incubación de la muestra con resina, el sobrenadante se vertió a través de un filtro (es decir, un BD Falcon™ Cell Strainer (40 µm) en el tubo usado para tinción. Falcon™ es una marca registrada de Becton, Dickinson and Company.
- 25

Tinción de muestra tratada con resina y análisis por FACS.

- 30 Los extractos de las muestras tratadas con resina fueron teñidos con fluorescencia utilizando EDTA 0,5 mM, HEPES 20 mM, stock 1:100 de tinte colorante de ácido nucleico (por ejemplo, SYTO® 13 por Invitrogen) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Dos minutos antes de finalizar la tinción, se añadió amarillo de nitrazina al 10%. La muestra tratada con resina se analizó mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur™, usando un protocolo estándar. Otras muestras idénticas que no se combinaron con la resina fueron también teñidas y utilizadas como control.

- 35 Resultados.

- Después del tratamiento con resina y apagador, las intensidades de fluorescencia aumentaron 17%, 76%, 174% y 108% para *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* 27853 y *P. aeruginosa* 9027, respectivamente, en comparación con las muestras que no fueron tratadas con resina (véanse las Figs. 2 y 3). Los resultados de citometría de flujo se correlacionaron bien con los resultados del recuento de colonias para todas las bacterias probadas. Véase la Fig. 4.
- 40 Por ejemplo, la muestra de *P. aeruginosa* tratada con resina dió $8,1 \times 10^4$ cfu/ml por citometría de flujo y $8,7 \times 10^4$ cfu/ml por recuento de colonias. La muestra de *P. aeruginosa* que no fue tratada con resina produjo $4,9 \times 10^4$ cfu/ml en citometría de flujo y $1,1 \times 10^5$ cfu/ml por recuento de colonias. Este resultado, que fue obtenido de la información de la fig. 3 (FL1 = 5044) indica que la muestra no tratada con resina no se puede correlacionar con las medidas del recuento de colonias. Basándose en los resultados de la muestra sin tratar, parece haber una inaceptablemente elevada interferencia desde las partículas de matriz compleja que tienen como resultado una señal detectable baja.
- 45

- Debido a la presencia de la resina, las intensidades de tinción fluorescente global de las bacterias gram-positivas eran ligeramente inferiores a las intensidades de tinción para las bacterias gram-positivas en ausencia de la resina (entre 3,4% y 9,7%). Sin embargo, debido a las elevadas intensidades de tinción fluorescente de las tres cepas gram-positivas analizadas (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *L. monocytogenes*), la intensidad de tinción inferior no tuvo efecto sobre la precisión ni la sensibilidad del recuento de bacterias.
- 50

También se observó una pequeña cantidad de partículas similares a bacterias fluorescentes en las muestras de carne no punzada tratadas con resina, que se consideró que era mero fondo.

5 Se observó que la resina elimina la interferencia y proporciona muestras que dieron señales de fluorescencia más altas para algunas poblaciones bacterianas sin una pérdida significativa de bacterias en las muestras (por ejemplo, menos del 30% de poblaciones bacterianas en las muestras tratadas con resina en comparación con cantidades que se proyectan por cálculo que existan en el muestra basándose en cantidades de bacterias realmente añadidas a la muestra (es decir, el cálculo se basa en la muestra punzada con una cantidad conocida de bacterias).

10 El procedimiento completo necesitó solamente 30 minutos de incubación con resina a temperatura ambiente, seguido por una simple etapa de separación. Como es probable que el citómetro de flujo esté obstruido por las matrices complejas (por ejemplo, partículas de carne), una etapa de filtración después del tratamiento con resina no supone añadir un paso adicional ya que tal paso se requiere incluso sin el tratamiento de resina. Eliminando las partículas de interferencia de las muestras ya no eran necesarios agentes de afinidad para aislar microorganismos de otros constituyentes de las muestras.

REIVINDICACIONES

1. Un método de análisis de una muestra biológica o medioambiental para detectar la presencia o ausencia de al menos un microorganismo objetivo, que comprende:
- preparar una muestra;
- 5 combinar la muestra con una resina seleccionada para unirse a partículas no objetivo de la muestra, en donde la resina es XAD-4;
- eliminar la resina de la muestra, llevándose la resina consigo las partículas no objetivo;
- combinar la muestra con un tinte de ácidos nucleicos después de eliminar la resina de la misma, en donde el tinte de ácido nucleico permea y marca el al menos un microorganismo objetivo; y
- 10 analizar la muestra preparada usando un citómetro de flujo.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra biológica o medioambiental es una muestra derivada de una matriz compleja seleccionada entre el grupo que consiste en productos alimenticios, cosméticos y muestras de suelo.
- 15 3. El método según la reivindicación 2, en donde el producto alimenticio se selecciona entre el grupo que consiste en carne, leche, huevos, mantequilla y agua.
4. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra y la resina se incuban a temperatura ambiente.
5. El método según la reivindicación 1, en donde el marcador de tinte de ácido nucleico es un marcador fluorescente.
6. El método según la reivindicación 1 que comprende además añadir un apagador a la muestra biológica, en donde el apagador se selecciona para suprimir la fluorescencia no deseada.
- 20 7. Un ensayo para una muestra biológica o medioambiental para determinar la presencia, la ausencia o la cantidad de microorganismos viables en la muestra, que comprende:
- preparar una muestra añadiendo una resina a la muestra biológica o medioambiental, la resina seleccionada para unirse a partículas no objetivo de la muestra, en donde la resina se elige entre un grupo que consiste en una resina hidrofóbica, una resina poliaromática, una resina porosa y un adsorbente de resina polimérica no funcional;
- 25 eliminar la resina de la muestra, llevándose la resina consigo las partículas no objetivo;
- añadir a la muestra una cantidad en exceso de moléculas de reducción de señal de fondo que no permean microorganismos viables de la muestra y que se unen a partículas diana que permanecen combinadas con la muestra después de que la resina ha sido eliminada, en donde las propiedades de unión de la molécula de reducción de la señal de fondo a las partículas no diana que quedan es similar a las propiedades de unión de un tinte de ácido nucleico a las partículas no diana;
- 30 añadir el tinte de ácido nucleico que permea y marca células viables a la muestra pero que se evita del marcado de al menos algunas de las partículas no objetivo; y
- analizar la muestra preparada usando un citómetro de flujo;
- 35 y en donde los tintes de ácido nucleico se añaden secuencial o simultáneamente con las moléculas de reducción de la señal de fondo.
8. El ensayo según la reivindicación 7, en donde la muestra biológica o medioambiental es una muestra derivada de una matriz compleja.
9. El ensayo según la reivindicación 7, en donde el marcador de tinte de ácido nucleico es un marcador fluorescente.
- 40 10. Un ensayo para una muestra biológica o medioambiental para determinar la presencia, la ausencia o la cantidad de microorganismos viables en la muestra, que comprende:
- preparar una muestra añadiendo una resina a la muestra biológica o medioambiental, seleccionada la resina para unirse a partículas no diana de la muestra, en donde la resina se selecciona entre un grupo que consiste

en resina hidrofóbica, una resina poliaromática, una resina porosa y un adsorbente de resina polimérica no funcional;

eliminar la resina de la muestra, llevándose la resina consigo las partículas no diana;

5 añadir a la muestra una sustancia de reducción de la señal de fondo que comprende un colorante que tiene un dominio de unión de ácido nucleico ligado covalentemente a un apagador fluorescente, que se une a partículas no objetivo que permanecen en la muestra después de que la resina se elimina de la misma;

añadir un tinte de ácido nucleico a la muestra, en donde el tinte de ácido nucleico permea y marca las células viables en la muestra; y

analizar la muestra preparada usando un citómetro de flujo;

10 en donde los apagadores fluorescentes apagan la señal fluorescente del tinte de ácido nucleico por superposición de espectros, la sustancia de reducción de la señal de fondo se une a las partículas no objetivo de una manera similar y con eficacia similar a como tiñe el ácido nucleico y la sustancia de reducción de la señal de fondo no permea microorganismos viables objetivo, y

15 en donde los tintes de ácido nucleico se añaden secuencial o simultáneamente con la sustancia de reducción de la señal de fondo.

11. El ensayo según la reivindicación 10, en donde la muestra biológica o medioambiental es una muestra derivada de una matriz compleja.

12. El ensayo según la reivindicación 10, en donde el marcador de tinte de ácido nucleico es un marcador fluorescente.

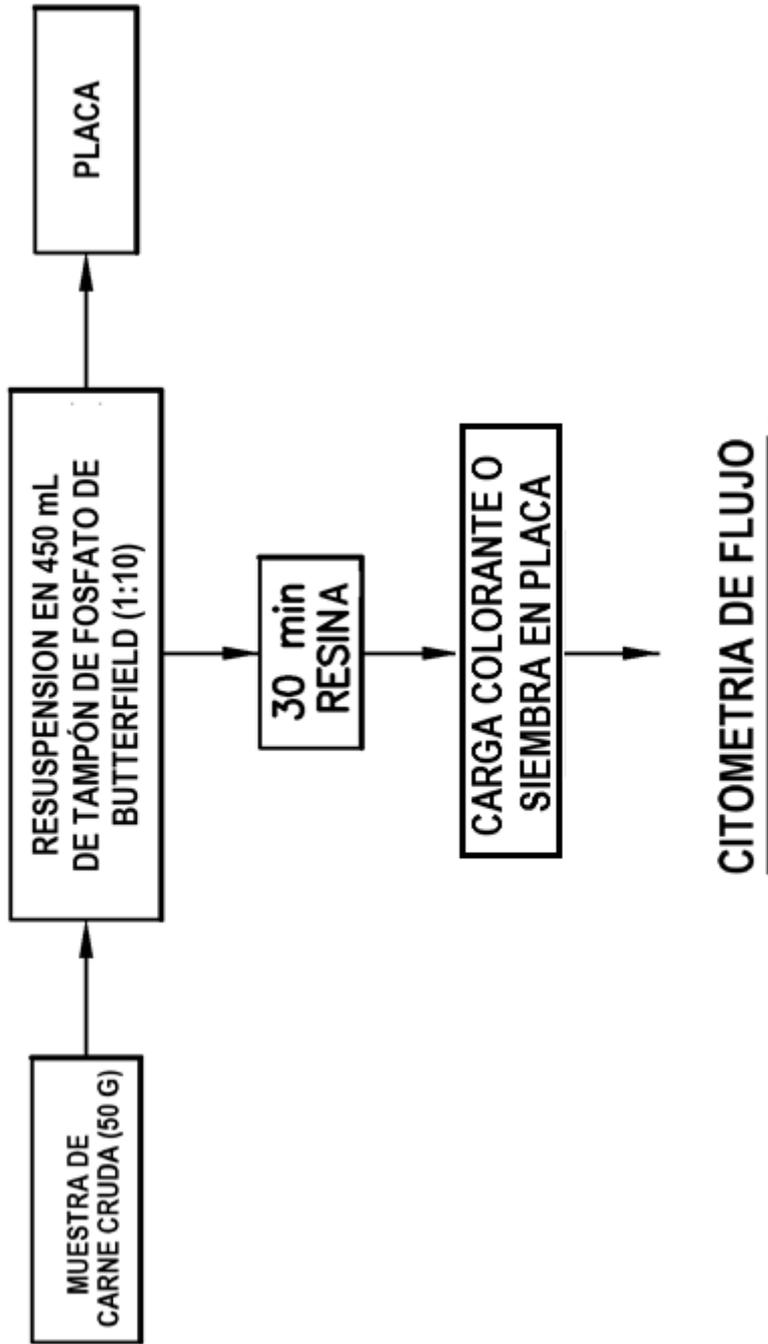


FIG.1

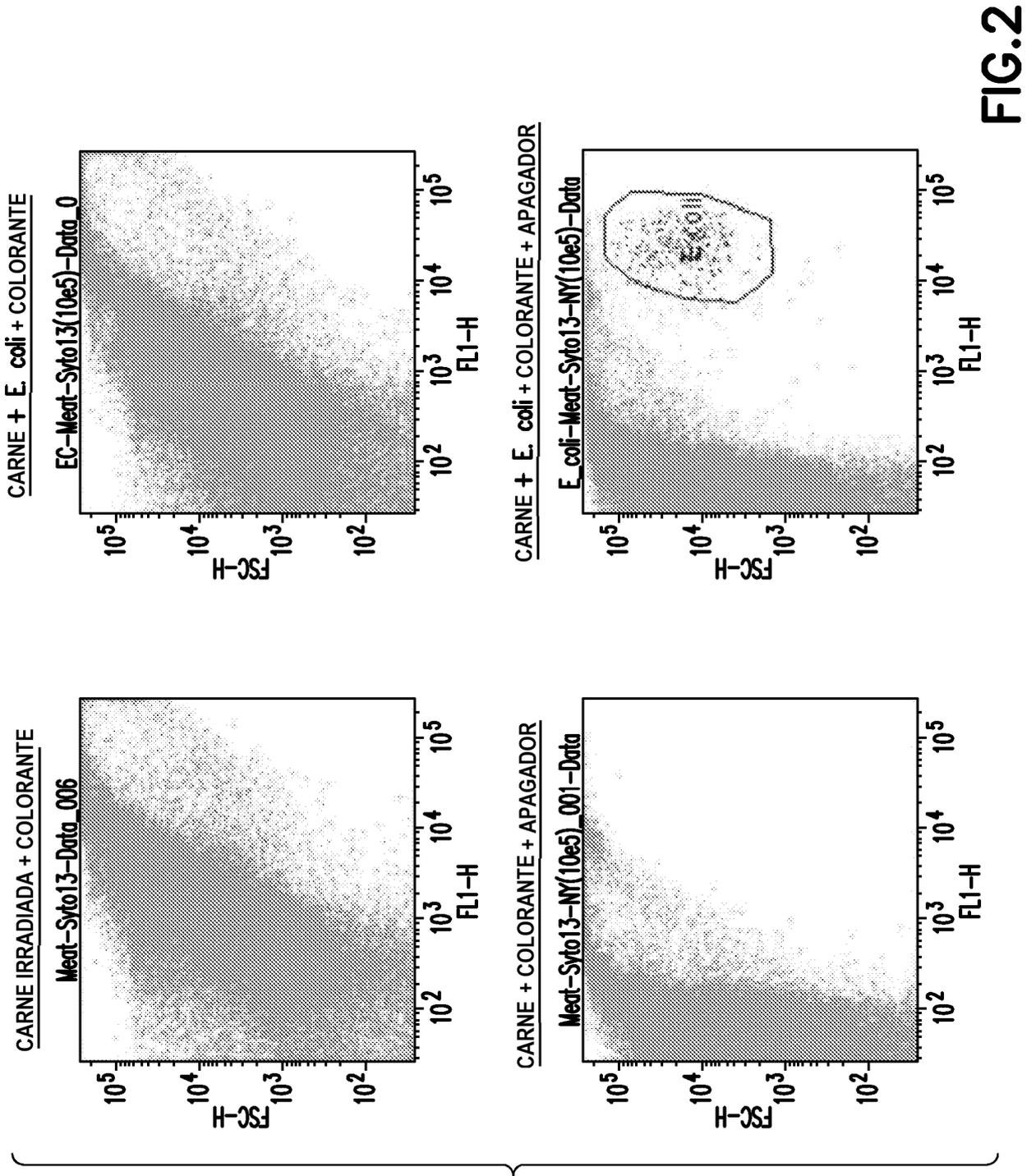
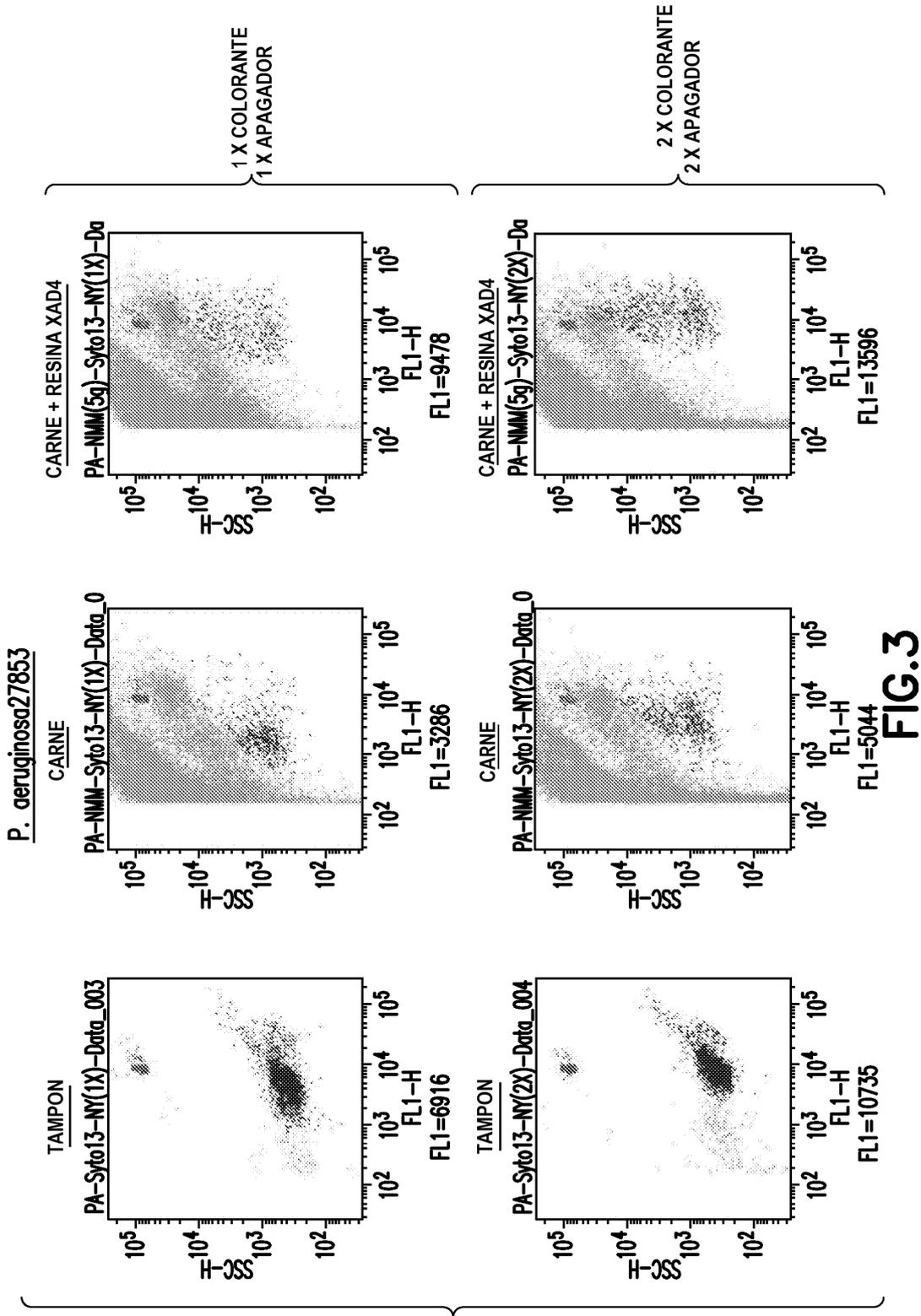


FIG.2



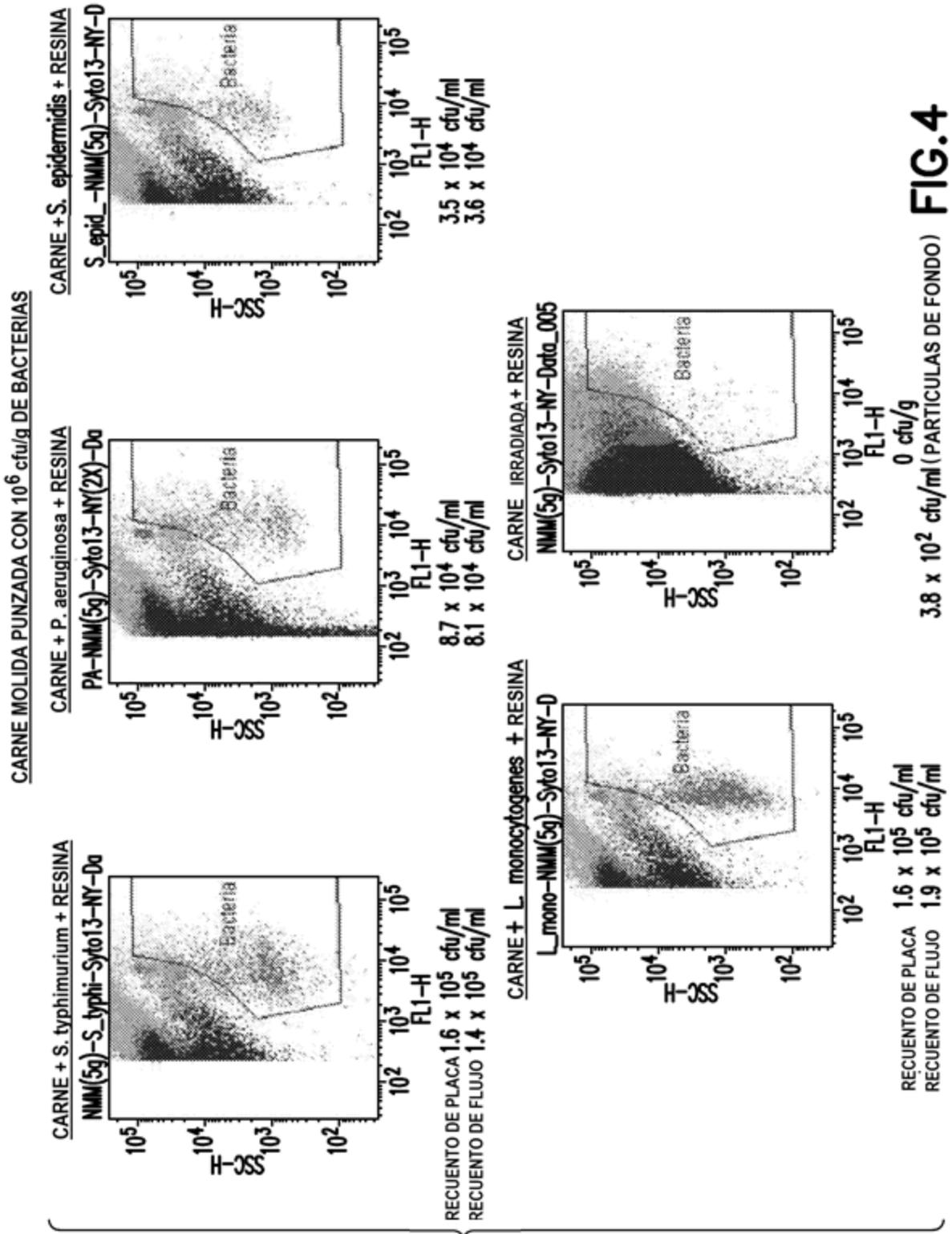


FIG.4