(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 721 664**

(51) Int. CI.:

C12N 1/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2013 PCT/US2013/028249**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13130759**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013 E 13708630 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2820120**

(54) Título: **Formulaciones y proceso para aislar un microorganismo viable de hemocultivos positivos**

(30) Prioridad:

29.02.2012 US 201261604732 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

KIRCHER, SUSAN, M.;
WHITE, VANDA;
BRASSO, WILLIAM, B.;
LUPER, DYAN;
ZHOU, JAMES, Y.;
ROSALES, JULIE, L.;
BRUTON, JEFFERY, H.;
MANTLO, JOHN, D;
MALICK, ADRIEN, P.;
CALLIHAN, DONALD, R.;
TURNG, BEN;
FENG, LIPING;
GOSNELL, CURTIS, M.;
BEATY, SHAWN y
DOUGLASS, JOHN, P.

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Formulaciones y proceso para aislar un microorganismo viable de hemocultivos positivos

Antecedentes de la invención

La sepsis es una afección médica grave provocada por una respuesta abrumadora del sistema inmunitario del hospedador a la infección. Puede desencadenar una inflamación generalizada, lo que puede dar lugar a una alteración del flujo sanguíneo. A medida que avanza la sepsis, los órganos del cuerpo pueden quedar privados de oxígeno y nutrientes, provocando daños permanentes y eventuales insuficiencias. Si se deja sin diagnosticar correctamente o, por lo demás, no se trata, el corazón puede debilitarse y puede producirse un choque séptico, lo que conduce a la insuficiencia de múltiples órganos y a la muerte. Se necesitan hemocultivos para detectar la presencia de bacterias o levaduras en la sangre de los pacientes con sepsis. Si hay un microorganismo presente, (hemocultivo positivo ("HCP")) el microorganismo o microorganismos deben identificarse y determinarse la susceptibilidad a los antibióticos para proporcionar el tratamiento adecuado. Las muestras de HCP se usan para aislar, identificar y realizar ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos ("ESA"). Los microorganismos con frecuencia se identifican mediante métodos tales como la espectrometría de masas, incluyendo MALDI-TOF/EM, o métodos basados en el crecimiento fenotípico, tales como Phoenix™ ID.

Con el fin de identificar el microorganismo o microorganismos, realizar análisis fenotípicos en los microorganismos y realizar ensayos ESA, es necesario aislar el microorganismo o microorganismos intactos y viables de las células sanguíneas y otros materiales de la muestra recogida. Para la identificación del microorganismo mediante espectrometría de masas, la muestra microbiana debe estar suficientemente desprovista de sustancias que se sabe que interfieren con la identificación por MALDI-TOF/EM, tales como los componentes de las células sanguíneas, otros residuos celulares y sales. Además, la muestra microbiana debe ser de una cantidad suficiente para obtener una identificación fiable. Los métodos de identificación fenotípica, tales como Phoenix™ ID, requieren un microorganismo intacto y viable, sin sustancias que puedan interferir con los sustratos enzimáticos del ensayo. Para los ensayos ESA, tales como el ESA Phoenix™, la muestra microbiana debe contener microorganismos viables e inalterados capaces de crecer en presencia de antibióticos, si existen mecanismos de resistencia, durante la realización del ensayo. Es importante que todos los métodos tengan una cantidad y una pureza suficientes, puesto que el arrastre de sangre residual o componentes del medio interferirá ya sea directamente o mediante el aumento falso de la concentración (turbidez) de microorganismos.

Las técnicas actuales para aislar microorganismos viables de una muestra de HCP incluyen el subcultivo del microorganismo o microorganismos, que pueden durar hasta 72 horas. Esto da como resultado el retraso del tratamiento o el tratamiento con antibióticos inadecuados.

Determinadas cepas de microorganismos son particularmente difíciles de aislar de una muestra de HCP manteniendo la viabilidad del organismo, tales como, pero sin limitación, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Parte de esta dificultad se debe a la activación de la autolisina por *S. pneumoniae*, lo que hace que las células microbianas se "autodestruyan". Véase "Streptococcus pneumoniae *Antigen Test Using Positive Blood Culture Bottles as an Alternative Method To Diagnose Pneumococcal Bacteremia*", Journal of Clinical Microbiology, Vol. 43, N.º 5, mayo de 2005, páginas 2510-2512. El método actual para aislar microorganismos de pacientes sépticos, incluyendo, *S. pneumoniae,* Incluye inocular frascos de hemocultivo. Una vez que se consigue una señal positiva, una parte de la muestra de HCP se retira para realizar una tinción de Gram y otra parte se usa para subcultivar el microorganismo. Las colonias microbianas del subcultivo se usan para realizar ensayos posteriores tales como la identificación por MALDI-TOF/EM, métodos de identificación fenotípica y ensayos ESA.

Las técnicas adicionales para aislar microorganismos viables de una muestra de HCP con frecuencia utilizan métodos de separación de líquidos que contienen tampones de lisis con detergentes que lisan las células sanguíneas en la muestra de HCP. Después de la lisis, las células sanguíneas lisadas pueden retirarse conservando el microorganismo o microorganismos. Sin embargo, el uso de estos tampones de lisis con frecuencia da como resultado microorganismos comprometidos, dañados o no viables, que son insuficientes para realizar determinados métodos de identificación basados en el crecimiento, tales como los ensayos ESA.

Uno de dichos métodos de separación de líquidos, el sistema Bruker Sepsityper™, permite el ensayo directo del microorganismo a partir de una muestra de HCP mediante MALDI-TOF/EM sin la necesidad de subcultivar el microorganismo. Este método usa dodecil sulfato de sodio ("SDS") y centrifugación para generar un sedimento de microbios. Si bien el método Sepsityper™ generalmente respaldará los ensayos MALDI-TOF/EM del sedimento microbiano, no existe una viabilidad suficiente para respaldar los métodos de identificación basados en el crecimiento y los métodos ESA, debido a la interacción de los detergentes fuertes con la pared celular microbiana.

Prod'hom *et al.*, "*Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets*", Journal of Clinical Microbiology, vol. 48, N.º 4, páginas 1481-1483 (17 de febrero de 2010) desvela un método para lisar eritrocitos en una muestra de HCP usando cloruro de amonio para preparar un sedimento bacteriano para el análisis por MALDI-TOF/EM. Sin embargo, estos métodos son

insuficientes para obtener datos fiables de MALDI-TOF/EM en un panel de microorganismos, incluyendo *S. pneumoniae.* Además, no hay indicios de que estos métodos mantengan la viabilidad suficiente del microorganismo para su uso en los métodos de identificación basados en el crecimiento y en los ensayos ESA.

Hansson *et al*., "*Microfluidic Blood Sample Preparation for Rapid Sepsis Diagnostics*", *KTH Engineering Sciences*, (2012) sugiere el uso de detergentes para lisar células sanguíneas y lisar selectivamente determinados tipos de células sanguíneas con cloruro de amonio. Sin embargo, esta referencia no dice nada con respecto a formulaciones o métodos específicos que permitan el aislamiento de microorganismos viables de una muestra de HCP sin sustancias interferentes y que permitan múltiples ensayos corriente abajo de una muestra de HCP, tales como tanto identificación por MALDI-TOF/EM como ensayos ESA.

Tanto M. Drancourt, "*Detection of Microorganisms in Blood Specimens Using Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry: A Review*", *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 1620-1625, (2010) como el documento WO 2010/100612 de Nassif *et al*. describen métodos para aislar microorganismos de una muestra de HCP que incluyen retirar eritrocitos de una muestra de HCP mediante la adición de saponina y/o cloruro de amonio a una porción de la muestra de HCP, el centrifugado de la mezcla y el lavado del sedimento resultante con agua para retirar las proteínas sanguíneas residuales. Sin embargo, estos métodos producen una identificación no uniforme del microorganismo a nivel de especie en un panel de microorganismos y/o no consiguen identificar *S. pneumoniae.* Además, no hay ninguna indicación de que estos métodos den como resultado un sedimento microbiano con suficiente viabilidad para realizar métodos de ensayo basados en el crecimiento, tales como los ESA.

En consecuencia, es deseable desarrollar reactivos y métodos que separen rápidamente el microorganismo o microorganismos de una muestra de HCP manteniendo la viabilidad del microorganismo o microorganismos, de manera que puedan realizarse métodos analíticos basados en el crecimiento que requieran la viabilidad celular, tales como los ensayos ESA. Adicionalmente, es deseable que los reactivos y los métodos se puedan usar para aislar células viables de todos los tipos de microorganismos, incluyendo *S. pneumoniae.*

El documento US 2010/129857 se refiere a un método de separación, caracterización y/o identificación de microorganismos de muestras complejas tales como cultivos que contienen sangre.

Breve sumario de la invención

La presente invención se refiere a [1] un tampón para aislar y concentrar microorganismos viables de una muestra de hemocultivo positivo que comprende una solución base que comprende un caldo nutritivo; al menos un detergente no iónico que comprende saponina y tritón X100; al menos un tiol; y opcionalmente, cloruro de amonio, en el que la concentración del caldo nutritivo en el tampón es de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 50 g/l, la concentración de los detergentes no iónicos en el tampón es de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 20 g/l, la concentración de al menos un tiol en el tampón es de aproximadamente 0,005 g/l a 4 g/l y la concentración del cloruro de amonio opcional en el tampón, si está presente, es de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 80 g/l, en el que las cantidades relativas de la solución base, el al menos un detergente no iónico y el al menos un tiol en el tampón se seleccionan para conservar la viabilidad de *S. pneumoniae*.

La invención también se refiere a [2] un método para aislar y concentrar microorganismos viables de una muestra de hemocultivo positivo que comprende:
mezclar una porción de una muestra de hemocultivo positivo con el tampón de [1] para producir una mezcla, en la que la cantidad del tampón con respecto a la muestra de hemocultivo positivo es de manera que las células se lisen y se conserve la viabilidad del microorganismo en la muestra de hemocultivo positivo;
opcionalmente, incubar la mezcla;
centrifugar la mezcla para producir un sedimento y un sobrenadante;
descartar el sobrenadante conservando el sedimento;
resuspender el sedimento con el tampón para crear un sedimento resuspendido;
centrifugar el sedimento resuspendido para producir un segundo sobrenadante y un segundo sedimento; y
descartar el segundo sobrenadante conservando el segundo sedimento que contiene microorganismos viables.
La invención se refiere adicionalmente a [3] un kit para aislar y concentrar microorganismos de una muestra de hemocultivo positivo que comprenda al menos una formulación del tampón de [1].

En el presente documento se proporcionan reactivos y métodos para aislar rápidamente células microbianas viables de una muestra de HCP que incluye *S. pneumoniae*. El sedimento microbiano resultante obtenido usando los diversos reactivos y métodos está suficientemente desprovisto de sustancias interferentes y puede usarse para métodos de identificación, tales como MALDI-TOF/EM, la identificación basada en el crecimiento y métodos ESA. Esto permite resultados rápidos sin la necesidad de subcultivar los microorganismos. La masa concentrada de células microbianas viables obtenida en el presente documento puede usarse tanto para la inoculación directa de sistemas de ID rápida, tales como MALDI-TOF/EM, y ensayos de ID/ESA (ESA) mediante sistemas convencionales o automatizados, tales como el sistema BD™ ID/ESA Phoenix™. Las diversas divulgaciones también pueden ser aplicables a otros sistemas, métodos de ensayo molecular, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y

otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

En el presente documento se describen diversos tampones de “lisis y lavado” que pueden usarse tanto para lisar células sanguíneas de mamíferos como para retirar por lavado residuos celulares y otros componentes de la sangre, manteniendo la viabilidad del microorganismo o microorganismos. Los tampones de “lisis y lavado” que se describen en el presente documento contienen una solución base que comprende, por ejemplo, sales, peptonas y otros nutrientes para proteger el microorganismo o microorganismos, así como reactivos líticos, tales como detergentes, tioles y cloruro de amonio para retirar residuos celulares de las células sanguíneas de mamíferos.

Los métodos para aislar el microorganismo o microorganismos de las muestras de HCP que se describen en el presente documento utilizan los tampones de “lisis y lavado” para producir rápidamente un sedimento de microorganismo viable que puede usarse para diversos métodos de ensayo corriente abajo, por ejemplo, la identificación por MALDI-TOF/EM y ensayos ESA. Los métodos que se desvelan proporcionan un proceso para aislar y concentrar rápidamente el microorganismos o microorganismo de muestras de HCP usando un tubo de preparación de muestras, una única etapa de lisado, una única etapa de lavado y tan solo una etapa de centrifugación. Estos métodos se adaptan fácilmente a los sistemas automatizados y no requieren el subcultivo del microorganismo con el fin de mantener la viabilidad celular.

Los métodos que se describen en el presente documento no utilizan sustancias que interfieran con los métodos para identificar el microorganismo o microorganismos, por ejemplo, la espectrometría de masas, o con métodos fenotípicos tales como Phoenix™ ID. Además, los métodos que se describen en el presente documento permiten el aislamiento rápido del microorganismo o microorganismos viables de una única muestra de HCP en cantidad suficiente para su uso en múltiples análisis corriente abajo, tales como la identificación por espectrometría de masas, ensayos de identificación fenotípicos o basados en el crecimiento. y ensayos ESA. Además, los métodos que se describen en el presente documento preparan una muestra para el análisis corriente abajo que identificará un amplio panel de microorganismos, incluyendo los organismos más difíciles de caracterizar, por ejemplo, *S. pneumoniae*.

En el presente documento se proporciona un kit que puede incluir, por ejemplo, uno o más de los tampones de “lisis y lavado” que se describen en el presente documento para aislar el microorganismo o microorganismos viables de una muestra.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra el método de una realización que se describe en el presente documento para el aislamiento de un microorganismo o microorganismos viables de una muestra de HCP.

La FIG. 2 muestra el método de una realización que se describe en el presente documento para el aislamiento de *S. pneumoniae* viable de una muestra de HCP.

Descripción detallada

El aislamiento y la concentración del microorganismo o microorganismos de las muestras de HCP usando los tampones de “lisis y lavado” y los métodos que se describen en el presente documento mantienen la viabilidad de las células microbianas y, en consecuencia, su respuesta a los ensayos basados en el crecimiento, tales como los ensayos ESA. Los métodos que se describen en el presente documento también reducen la cantidad de otras sustancias en la muestra, tales como residuos celulares, que pueden interferir con múltiples métodos de identificación tales como MALDI-TOF/EM y Phoenix™ ID. Los tampones que se describen en el presente documento se formulan para mantener la concentración de sales a un mínimo de manera de evitar la interferencia con el análisis de identificación por MALDI-TOF/EM.

Los tampones y los métodos que se describen en el presente documento se usan para aislar y realizar análisis corriente abajo en bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas o levaduras. En una realización, las bacterias grampositivas incluyen *S. pneumoniae*, así como otras especies de *estreptococos.*

Tampón de “lisis y lavado”

Los tampones de “lisis y lavado” que se describen en el presente documento contienen un equilibrio de reactivos que estabilizan el microorganismo o microorganismos, así como reactivos líticos para lisar células sanguíneas. El tampón contiene una solución base que contiene sales, peptonas y otros nutrientes para estabilizar el microorganismo o microorganismos, así como detergentes no iónicos, tioles y, opcionalmente, cloruro de amonio, para lisar células sanguíneas en la muestra.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que mientras la solución base puede ayudar a estabilizar los microorganismos, los reactivos líticos lisan las células sanguíneas y retiran los residuos celulares interferentes. Los tampones de “lisis y lavado” que se describen en el presente documento proporcionan la posibilidad de múltiples mecanismos líticos independientes: acuoso (lisis osmótica), detergentes (solubilización de membrana), tioles

(interrupción de las interacciones proteína-proteína en las membranas) y cloruro de amonio (las membranas de lo eritrocitos son eficazmente permeables al cloruro de amonio y la lisis celular se produce debido a la presión osmótica desequilibrada de su contenido de coloide). La combinación de múltiples reactivos líticos permite que cada uno de los reactivos líticos sea menos agresivo para el microorganismo o microorganismos y que puedan usarse durante un tiempo más corto que si se usara por separado.

La solución base puede contener un caldo nutritivo para el microorganismo o microorganismos, un tampón isotónico, peptonas y/o sales. El caldo nutritivo puede ser, por ejemplo, el caldo de soja Trypticase™. De acuerdo con la invención, la concentración del caldo nutritivo en el tampón de "lisis y lavado" es de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 50 g/l. Los tampones isotónicos son tampones clínicos conocidos por los expertos en la materia que son compatibles con muestras de sangre completa. Dichos tampones son normalmente mezclas de fosfato de sodio, fosfato de potasio y solución salina, tales como cloruro de sodio o solución salina tamponada con fosfato. En una realización de ejemplo, la concentración de tampón isotónico es de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 85 g/l. En otra realización de ejemplo, el tampón isotónico es un tampón de fosfato. En una realización, las peptonas incluyen peptonas de caseína y/o peptonas de soja. Los constituyentes adicionales de la solución base contemplada incluyen, por ejemplo, piruvato de sodio, extracto de levadura, citrato de sodio, peptonas de carne y/o dextrosa.

El tampón de "lisis y lavado" contiene un detergente no iónico o mezclas de detergentes no iónicos. En esta realización, al menos un detergente no iónico en el tampón de "lisis y lavado" es un detergente hemolítico no iónico que lisa selectivamente las células sanguíneas, pero no lisa el microorganismo o microorganismos. De acuerdo con la invención, los detergentes hemolíticos no iónicos se seleccionan entre Triton™ X-100 y saponina. Otros detergentes no iónicos pueden incluir, por ejemplo, la familia Tween®, la familia Brij®, octil-b-glucósido, la familia Tergitol®, la familia CYMAL®, la familia MEGA (incluyendo Noctanoil-N-metilglucamina, N-nonanoílo, N-decanoílo), familia PLURONIC® tal como F-68, digitoninas y la familia CHAP. De acuerdo con la invención, la concentración de detergente o detergentes no iónicos en el tampón de "lisis y lavado" es de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 20 g/l. En una realización, el tampón de "lisis y lavado" contiene Triton™ X-100 a una concentración de aproximadamente 6,7 g/l.

En una realización, el tampón de "lisis y lavado" contiene Triton™ X-100. La concentración de Triton™ X-100 se selecciona para conservar la viabilidad de *S. pneumoniae*. Realizaciones de ejemplo contemplan concentraciones de Triton™ X-100 de hasta aproximadamente 1 g/l. En otra realización, el tampón de "lisis y lavado" contiene Triton™ X-100 a una concentración de aproximadamente 0,335 g/l. En otra realización más, el tampón de "lisis y lavado" contiene Triton™ X-100 a una concentración de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 1 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,9 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,8 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,7 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,6 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,5 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,4 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 1 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 1 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,9 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,8 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,7 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,6 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,5 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,4 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,9 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,8 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,7 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,6 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,5 g/l o de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,4 g/l. Los tampones de "lisis y lavado" que contienen una concentración de Triton™ X-100 seleccionada para conservar la viabilidad de *S. pneumoniae* también pueden usarse para aislar células microbianas viables de un organismo distinto de *S. pneumoniae* sin la necesidad de un tampón de "lisis y lavado" diferente para estos organismos adicionales.

En una realización, el tampón de "lisis y lavado" puede incluir opcionalmente cloruro de amonio. En esta realización, la concentración de cloruro de amonio en el tampón de "lisis y lavado" es de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 80 g/l.

Sin quedar ligado a teoría particular alguna, la adición de cloruro de amonio u otros componentes líticos puede ayudar a mitigar los efectos de los otros componentes líticos del tampón de "lisis y lavado" sobre la viabilidad del microorganismo. Cuando se usan diversos reactivos líticos, se necesita una cantidad suficiente con el fin de lisar las células sanguíneas en la muestra de HCP. Esto con frecuencia tiene el efecto no deseado de provocar la muerte celular microbiana. Los detergentes, los tioles y el cloruro de amonio emplean diferentes mecanismos de acción para lisar las células sanguíneas. Cuando se combinan múltiples mecanismos líticos en un tampón de "lisis y lavado", cada uno de los diferentes componentes líticos puede usarse posiblemente en una cantidad menor. Esta posibilidad reduce el efecto negativo de lisar las células microbianas, pero puede ser suficiente para lisar las células sanguíneas, dando como resultado una lisis de células sanguíneas más eficiente que cuando se usa cada uno de los ingredientes líticos solos. Por tanto, la viabilidad de las células microbianas puede mantenerse eliminando los componentes de células sanguíneas no deseados.

En una realización, el tampón de "lisis y lavado" contiene una solución base que comprende solución salina tamponada con fosfato, extracto de levadura, citrato de sodio, peptonas de carne, dextrosa, piruvato de sodio; tioles que comprenden tioglicolato de sodio y HCL de L-cisteína; detergentes no iónicos que comprenden saponina y

Triton™ X-100; y opcionalmente PBS.

En otra realización, el tampón de “lisis y lavado” contiene una solución base que comprende caldo de soja Trypticase™, extracto de levadura, citrato de sodio, peptonas de carne, piruvato de sodio; tioles que comprenden HCL de L-cisteína y tioglicolato de sodio; y detergentes no iónicos que comprenden saponina y Triton™ X-100.

En otra realización más, el tampón de “lisis y lavado” contiene una solución base que comprende caldo de soja Trypticase™; tioles que comprenden HCL de L-cisteína y tioglicolato de sodio; y detergentes no iónicos que comprenden saponina y Triton™ X-100.

En una realización, el tampón de “lisis y lavado” comprende: una solución base que comprende peptona de caseína a una concentración de aproximadamente 8 g/l a aproximadamente 35 g/l, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 10 g/l, peptona de soja a una concentración de aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 15 g/l y fosfato de potasio a una concentración de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 5 g/l; tioles que comprenden L-cisteína a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 2,5 g/l y tioglicolato de sodio a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 2,5 g/l; y detergentes no iónicos que comprenden saponina a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 10 g/l y Triton™ X100 a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 20 g/l.

En una realización, el tampón de “lisis y lavado” comprende una solución base que comprende peptona de caseína a una concentración de aproximadamente 8 g/l a aproximadamente 35 g/l, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 10 g/l, peptona de soja a una concentración de aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 15 g/l y fosfato de potasio a una concentración de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 5 g/l; tioles que comprenden L-cisteína a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 2,5 g/l y tioglicolato de sodio a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 2,5 g/l; detergentes no iónicos que comprenden saponina a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 10 g/l y Triton™ X100 a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 20 g/l; y cloruro de amonio a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 80 g/l.

En una realización, puede añadirse opcionalmente un agente antiespumante al tampón de “lisis y lavado” por conveniencia de fabricación. Preferentemente, el agente antiespumante no tiene ninguna repercusión demostrable en el rendimiento del tampón de “lisis y lavado”. Los agentes antiespumantes son bien conocidos por los expertos en la materia y no se desvelan con detalle en el presente documento. La selección de un agente antiespumante y la cantidad es en gran medida una cuestión de elección de diseño y está dentro de las capacidades de los expertos en la materia basándose en los requisitos del tampón de “lisis y lavado” que se describen en el presente documento. En una realización, el agente antiespumante en el tampón de “lisis y lavado” está a una concentración de 0,1 g/l.

Las concentraciones de los diversos constituyentes de los tampones de “lisis y lavado” que se describen en el presente documento representan las concentraciones finales de cada constituyente en el tampón de “lisis y lavado”. Con frecuencia, se mezcla una relación de volumen 1:1 de muestra de HCP con el tampón de “lisis y lavado”; sin embargo, se contemplan otras relaciones de volumen. En consecuencia, las concentraciones de cada constituyente en el tampón de “lisis y lavado” pueden ajustarse para tener en cuenta los cambios en la relación de volumen del tampón de “lisis y lavado” con respecto a la muestra de HCP con el fin de conseguir una concentración final deseada de los constituyentes del tampón “de lisis y lavado” cuando se mezcla con la muestra de HCP.

En una realización, el tampón de “lisis y lavado” contiene tanto saponina como Triton™ X-100, pero no contiene ningún agente antiespumante. Sin quedar ligado a teoría alguna, la combinación de saponina y Triton™ X-100 produce mucha menos espuma en las muestras de HCP tratadas en comparación con el uso de saponina como el único detergente no iónico en el tampón de “lisis y lavado”. Esta reducción de la formación de espuma mejora el flujo de trabajo, facilita la retirada del sobrenadante después de la centrifugación y reduce o elimina la necesidad de reactivos antiespumantes (es decir, fluidos de silicona).

En una realización, el tampón de “lisis y lavado” puede incluir una solución que contenga colina, por ejemplo, las soluciones que contienen colina que se describen en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 13/647.072, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Aunque sin quedar ligado a teoría particular alguna, la adición de una solución que contenga colina al tampón de “lisis y lavado” puede inhibir, prevenir y/o mitigar la autolisis del microorganismo, en particular de *S. pneumonia,* en presencia de componentes líticos del tampón de “lisis y lavado”.

En otra realización, se proporciona un kit que puede comprender, por ejemplo, uno o más de los tampones de “lisis y lavado” que se describen en el presente documento para aislar el microorganismo o microorganismos viables de una muestra de HCP.

Métodos para aislar el microrganismo o microorganismos de una muestra de HCP

Los métodos para aislar el microorganismo o microorganismos de una muestra que se sospecha que contiene al

menos un microorganismo, por ejemplo, una muestra de HCP, que se describen en el presente documento, pueden utilizar los diversos tampones de “lisis y lavado” contemplados para producir rápidamente un sedimento microbiano viable que puede usarse para diversos métodos de ensayo corriente abajo, tales como la identificación por MALDI-TOF/EM, los ensayos fenotípicos basados en el crecimiento y los ensayos ESA. En una realización, el método incluye añadir una porción de una muestra de HCP con el tampón de “lisis y lavado” para formar una mezcla. En una realización, la relación de volumen de la muestra de HCP con respecto al tampón de “lisis y lavado” es 1:1. La mezcla se incuba durante un período de tiempo para lisar las células sanguíneas en la muestra de HCP.

De acuerdo con la invención, el tampón de “lisis y lavado” mezclado con la porción de la muestra de HCP comprende al menos un detergente no iónico a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 20 g/l. En una realización, el tampón de “lisis y lavado” contiene Triton™ X-100 a una concentración de aproximadamente 6,7 g/l. En otra realización, el tampón de “lisis y lavado” contiene Triton™ X-100 a una concentración de hasta aproximadamente 1 g/l. En otra realización más, el tampón de “lisis y lavado” contiene Triton™ X-100 a aproximadamente 0,335 g/l. En aún otra realización más, el tampón de “lisis y lavado” contiene Triton™ X-100 a una concentración de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 1 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,9 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,8 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,7 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,6 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,5 g/l, de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,4 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 1 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 1 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,9 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,8 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,7 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,6 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,5 g/l, de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 0,4 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,9 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,8 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,7 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,6 g/l, de aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,5 g/l o aproximadamente 0,3 g/l a aproximadamente 0,4 g/l.

En una realización, después de preparar la mezcla a partir de la combinación de una porción de la muestra de HCP con el tampón de “lisis y lavado”, la mezcla se incuba durante hasta aproximadamente 5 minutos. En otra realización, la mezcla se invierte varias veces durante la incubación para garantizar una mezcla uniforme de la muestra de HCP y el tampón de “lisis y lavado”. Después de la incubación, la mezcla se centrifuga para formar un sedimento que contiene microorganismos viables y un sobrenadante que contiene residuos de células sanguíneas. El intervalo de velocidad y el tiempo de centrifugación pueden optimizarse para conseguir un sedimento fácilmente discernible con el fin de retirar fácilmente el sobrenadante sin alterar el sedimento. Diversas variables afectarán a la velocidad y el tiempo de la centrifugación, incluyendo, por ejemplo, el volumen de la mezcla, el tamaño y la forma del tubo de muestra y el tipo de rotor. En una realización, la mezcla se centrifuga a una velocidad de aproximadamente 100 x *g* a aproximadamente 5000 x *g*. En otra realización, la mezcla se centrifuga durante hasta 10 minutos inclusive.

De acuerdo con la invención, después de la centrifugación, el sobrenadante se desecha mientras que el sedimento se lava con un segundo volumen del tampón de “lisis y lavado”. El tampón de “lisis y lavado” utilizado para la etapa de lavado puede tener la misma o diferente formulación que el tampón de “lisis y lavado” utilizado para lisar las células sanguíneas en la etapa de lisis. Después de lavar el sedimento, la mezcla se centrifuga por segunda vez. El sobrenadante, que contiene residuos de células sanguíneas, se desecha de nuevo conservando el sedimento que contiene microorganismos viables. Los líquidos trazan de la parte superior del sedimento pueden retirarse. Por último, el sedimento puede resuspenderse en una solución para el análisis corriente abajo. En una realización, el sedimento se resuspende en una solución a una concentración de al menos aproximadamente 4 McFarland.

El sedimento microbiano viable resultante de las diversas divulgaciones que se describen en el presente documento puede usarse para preparar una muestra común para diversos métodos de ensayo corriente abajo incluyendo la identificación por espectrometría de masas, por ejemplo, la identificación por MALDI-TOF/EM, la identificación basada en el crecimiento fenotípico, por ejemplo, Phoenix™ ID, y los ensayos ESA, por ejemplo, los ensayos Phoenix™ AST. Además, todo el método puede realizarse en un tubo de muestra sin la necesidad de transferir la muestra entre múltiples tubos. Por tanto, los métodos que se describen en el presente documento son fácilmente adaptables a sistemas automatizados.

Pueden implementarse técnicas tales como el mayor volumen de muestra de HCP, múltiples alícuotas de muestra de HCP, múltiples centrifugaciones, etc., que se describen en el presente documento, para aumentar el número de microorganismos en el volumen inicial para mejorar el rendimiento. Además, estos métodos proporcionan un método rápido de preparación de muestras y se automatizan fácilmente. Además, los métodos y los tampones que se describen en el presente documento someten las células sanguíneas a lisis, retiran sustancias interferentes de la muestra de HCP y proporcionan altos rendimientos de microorganismos viables. Como se proporciona en el presente documento, el rendimiento del sedimento microbiano viable puede aumentarse aumentando el volumen inicial de la muestra de HCP y/o realizando el método de aislamiento en varias alícuotas de una muestra de HCP y combinando los sedimentos microbianos resultantes en una muestra.

La FIG. 1 ilustra una realización de los métodos que se describen en el presente documento. Una porción de una

muestra de HCP, por ejemplo, 5 ml, se transfiere (100) a un tubo de muestra. Se añade (105) un volumen de tampón de “lisis y lavado”, por ejemplo, 5 ml, a la muestra de HCP y se mezclan (110), por ejemplo, durante 5 minutos. La mezcla se centrifuga (115), por ejemplo, a 2200 x *g* durante 10 minutos, dando como resultado un sedimento A que contiene el microorganismo o microorganismos viables y sobrenadante A que contiene residuos de células sanguíneas. El sobrenadante A se decanta y se desecha (120) conservando (125) el sedimento A. Se añade (130) un segundo volumen de tampón de “lisis y lavado”, por ejemplo, 5 ml, al sedimento A para resuspender el sedimento. El sedimento A resuspendido se mezcla (135) para crear una segunda mezcla. La segunda mezcla se centrifuga (140), por ejemplo, a 2200 x *g* durante 10 minutos, dando como resultado un sedimento B que contiene el microorganismo o microorganismos viables y el sobrenadante B que contiene residuos celulares adicionales que no se retiran en la primera etapa de centrifugación (115). El sobrenadante B se decanta y se desecha (145) conservando (150) el sedimento B. Al menos una porción del sedimento B se resuspende (155) en un líquido, por ejemplo, con 600 µl de agua desionizada estéril, para conseguir una suspensión microbiana densa, por ejemplo, una suspensión de aproximadamente 4 McFarland. La suspensión microbiana resultante puede usarse para diversos métodos de ensayo corriente abajo (160) tales como, por ejemplo, la identificación por MALDI/TOF-MS y la identificación fenotípica basada en el crecimiento, por ejemplo, la identificación por el sistema Phoenix™, y los métodos de ESA basados en el crecimiento, tales como los ensayos Phoenix™ AST.

En una realización de los métodos para aislar microorganismos viables que se describen en el presente documento, la muestra de HCP se incuba con una solución de colina antes o simultáneamente con los tampones de “lisis y lavado” como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 13/647.072, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En otra realización, se proporcionan métodos para el aislamiento de *S. pneumoniae* viable de una muestra de HCP. Estos métodos incluyen obtener una muestra de sangre que se sospecha que contiene al menos un microorganismo. Una porción de la muestra de sangre se añade a un frasco de hemocultivo anaeróbico, mientras que una segunda porción de la muestra de sangre se añade a un frasco de hemocultivo aeróbico. Los frascos se incuban hasta obtener una señal positiva. Una indicación precoz de la presencia de *S. pneumoniae* en la muestra de sangre se obtiene combinando una porción de una muestra de HCP aeróbico con el tampón de “lisis y lavado” que se describe en el presente documento para formar una mezcla, incubando la mezcla durante un período de tiempo para lisar las células sanguíneas y centrifugando la mezcla para formar un sedimento. Un sedimento de color verde proporciona una indicación temprana de la presencia de *S. pneumoniae* en la muestra de sangre. Como alternativa, se obtiene una indicación precoz de la presencia de *S. pneumoniae* en la muestra de sangre observando visualmente el frasco de hemocultivo aerobio positivo para obtener una solución de color verde.

Después de la presente indicación temprana de *S. pneumoniae,* la muestra de HCP anaeróbico puede usarse para aislar *S. pneumoniae* viable para el análisis corriente abajo usando cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento para el aislamiento de microorganismos viables. En una realización, el método incluye añadir una porción de una muestra de HCP anaeróbico con el tampón de “lisis y lavado” que se describe en el presente documento para formar una mezcla. La mezcla se incuba durante un período de tiempo para lisar las células sanguíneas en la muestra de HCP.

En una realización, los métodos para aislar *S. pneumoniae* viable incluyen el uso de un tampón de “lisis y lavado” que contiene Triton™ X-100. La concentración de Triton™ X-100 se selecciona para conservar la viabilidad de *S. pneumoniae.* Se contempla una concentración de hasta aproximadamente 1 g/l. En otra realización, los métodos para aislar *S. pneumoniae* viable incluyen el uso de un tampón de “lisis y lavado” que contiene Triton™ X-100 de aproximadamente 0,335 g/l.

En una realización, después de preparar la mezcla a partir de la combinación de una porción de la muestra de HCP con el tampón de “lisis y lavado”, la mezcla se incuba durante hasta 5 minutos aproximadamente. En otra realización, la mezcla se invierte varias veces durante la incubación para garantizar una mezcla uniforme de la muestra de HCP y el tampón de “lisis y lavado”. Después de la incubación, la mezcla se centrifuga para formar un sedimento que contiene microorganismos viables y un sobrenadante que contiene residuos de células sanguíneas.

Después de la centrifugación, el sobrenadante se desecha mientras que el sedimento, que contiene *S. pneumoniae* viable, se lava con un segundo volumen del tampón de “lisis y lavado”. El tampón de ”lisis y lavado” utilizado para la etapa de lavado puede tener la misma o diferente formulación que el tampón de “lisis y lavado” utilizado para lisar las células sanguíneas en la etapa de lisis. Después de lavar el sedimento, la mezcla se centrifuga por segunda vez. El sobrenadante, que contiene residuos de células sanguíneas, se desecha de nuevo mientras que el sedimento, que contiene *S. pneumoniae* viable, se conserva. Por último, el sedimento puede resuspenderse en una solución para el análisis corriente abajo.

Se ilustra una realización del método para aislar *S. pneumoniae* viable de una muestra de HCP en la FIG. 2. Se obtiene (200) una muestra de sangre que se sospecha que contiene *S. pneumoniae*. Una porción de la muestra de sangre (por ejemplo, 10 ml) se añade (205) a un frasco de hemocultivo anaeróbico, mientras que una segunda porción de la muestra de sangre (por ejemplo, 10 ml) se añade (210) a un frasco de hemocultivo aeróbico. Se obtiene (215) una señal positiva tanto en los frascos de HCP anaeróbico como aeróbico, lo que indica la presencia

de un microorganismo. Una porción de la muestra de HCP aeróbica, por ejemplo, 5 ml, se transfiere (220) a un tubo. Se añade (225) un volumen del tampón de "lisis y lavado" que se describe en el presente documento que contiene una concentración de Triton™ X-100 seleccionada para conservar la viabilidad de *S. pneumoniae,* por ejemplo, Triton™ X-100 0,335 g/l, por ejemplo, 5 ml, a la muestra de HCP para formar una mezcla. La mezcla se incuba (230) durante un período de tiempo (por ejemplo, 5 minutos) para lisar las células sanguíneas. La mezcla se centrifuga (235) para formar un sedimento de color verde que proporciona una indicación temprana (240) de la presencia *de S. pneumoniae.* en la muestra de sangre. Después de una indicación temprana *de S. pneumoniae* (240) se prepara (245) una porción de la muestra de HCP anaeróbico para su análisis corriente abajo usando cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento para aislar microorganismos viables de una muestra de HCP, incluyendo, por ejemplo, los métodos que se describen en la FIG. 1 usando un tampón de "lisis y lavado" que contiene una concentración de Triton™ X-100 seleccionada para conservar la viabilidad de *S. pneumoniae,* por ejemplo, Triton™ X-100 0,335 g/l.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se obtuvieron muestras de hemocultivo positivos inoculando un frasco de hemocultivo con *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) o *Staphylococcus aureus* (MRSA ATCC 43300) e inclubando hasta que se indicó una señal positiva. Una porción de la muestra de HCP (5 ml) se retiró directamente del frasco y se colocó en un tubo cónico de 15 ml. Se añadió cloruro de colina (0,5 ml de solución de cloruro de colina al 20 %) a la muestra de HCP, se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y se centrifugaron a 132 x *g* durante 5 minutos en una centrífuga Beckman J6-MI con un rotor JS-4.2. El sobrenadante se transfirió a un segundo tubo cónico de 15 ml y se mezcló con 5 ml de un tampón de "lisis y lavado" que contenía 16 g/l de cloruro de amonio, 6,7 g/l de Triton™ X-100 y BD Bactec Lytic 10 (número de catálogo 442265). La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra lisada se centrifugó después a 1855 x *g* durante 10 minutos. Después de retirar el sobrenadante, el sedimento de bacterias restante se resuspendió en 4,5 ml de caldo de identificación BD Phoenix™ (número de catálogo 246001). Se usó una porción del microorganismo recuperado para determinar la viabilidad del organismo por recuento en placa. Los resultados de los ensayos de viabilidad por recuento en placa indicaron 1,85 x 10^9 ufc/ml de *E. aerogenes* después de la lisis en comparación con 1,65 x 10^9 ufc/ml para la muestra de HCP antes de la lisis. Los ensayos de viabilidad también demostraron 1,25 x 10^8 ufc/ml para *S. aureus* después de la lisis en comparación con 2,00 x 10^8 ufc/ml para la muestra de HCP antes de la lisis.

Una segunda porción de la suspensión bacteriana recuperada se diluyó después con el caldo BD Phoenix™ ID a una concentración de 0,5 McFarland y se usó para el ensayo Phoenix™ ID/AST. El sistema BD Phoenix™ ID/AST se desvela en, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.922.593, 6.096.272, 6.372.485, 6.849.422 y 7.115.384, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia. Una porción del inóculo preparado anteriormente se usó para la identificación fenotípica por Phoenix™ ID y se vertió en la porción de identificación de un panel BD Phoenix™ ID/AST (Becton, Dickinson and Company) y se cerró herméticamente con un cierre de plástico. Una segunda porción del inóculo preparado anteriormente se usó para el ensayo ESA con Phoenix™ AST y se vertió en la porción ESA de un panel BD Phoenix™ ID/AST (Becton, Dickinson and Company) y se cerró herméticamente con un cierre de plástico. Se calculó la concentración inhibitoria mínima de susceptibilidad antimicrobiana (CIM) para una serie de antibióticos para cada uno de los sedimentos microbianos aislados. Los resultados de la CIM de los sedimentos microbianos se compararon con los resultados de la CIM de las mismas cepas obtenidas de cultivos puros en placas ("Control"). Esta comparación indica si el método de ensayo proporciona resultados sustancialmente equivalentes al método de control, es decir, la tasa de acuerdo esencial (AE) entre el método de ensayo y el método de control. Una diferencia de dilución de 0 indica un acuerdo exacto entre el método de ensayo y el método de control. Una diferencia de dilución de -1 o +1 indica que el método de ensayo se considera dentro de AE con respecto al método de control, es decir, dentro de la variación de ensayo normal. Las diferencias de dilución fuera de este intervalo, tales como, por ejemplo, -4, +4, -3, +3, -2 y +2, indican que los resultados no están dentro del acuerdo esencial para el antibiótico/microorganismo sometido a ensayo. Los métodos y la verificación de los resultados de ESA se describen adicionalmente en "*Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory*", *Cumitech* 31, (febrero de 1997, ASM Press).

Las bacterias recuperadas de ambas muestras de HCP dieron como resultado una identificación correcta por Phoenix™ como *E. aerogenes* y *S. aureus* con ambas muestras con un valor de confianza del 99 %. Los resultados de Phoenix™ AST mostraron un acuerdo esencial del 100 % (AE) en comparación con las muestras preparadas a partir de colonias sembradas en placas, es decir, la diferencia de dilución estaba dentro de una diferencia de dilución de -1 a +1. Los resultados de la ESA para *S. aureus* incluyeron la identificación correcta de los cuatro marcadores de resistencia esperados para la presente cepa de MRSA, incluyendo el estafilococo resistente a la meticilina (MRS), el estafilococo resistente mediado por mecA (mecA), el estafilococo productor de beta-lactamasa (BLACT) y el fenotipo MLSb de estafilococos (STAMLS).

Estos resultados demuestran que los tampones de "lisis y lavado" que se describen en el presente documento pueden usarse para aislar microorganismos viables de una muestra de HCP para la identificación corriente abajo y los ensayos ESA.

Ejemplo 2

Se obtuvieron cuatro muestras de hemocultivo positivos inoculando un frasco de hemocultivo con *Enterococcus faecium* (ATTC 700221), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) o *Proteus mirabilis* (ATCC 29906). Se prepararon cuatro tampones de "lisis y lavado" diferentes que comprendían las formulaciones que se resumen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1:

Tampón n.º 1	Medio Bactec Lytic 10 y Triton™ X-100 6,7 g/l
Tampón n.º 2	Medio Bactec Lytic 10, Triton™ X-100 3,35 g/l y cloruro de amonio 16 g/l
Tampón n.º 3	Medio Bactec Lytic 10, Triton™ X-100 3,35 g/l y cloruro de amonio 40 g/l
Tampón n.º 4	Medio Bactec Lytic 10, Triton™ X-100 3,35 g/l y cloruro de amonio 80 g/l

Se usó cada uno de los cuatro tampones de "lisis y lavado" para preparar un sedimento microbiano de cada una de las cuatro muestras de HCP para un total de 16 muestras preparadas. Para aislar microorganismos viables, se pretrató una porción de cada muestra de HCP (5 ml) con 0,5 ml de una solución de cloruro de colina al 20 % durante 20 minutos en un tubo cónico de 15 ml. Después de la incubación con la solución de cloruro de colina, se añadieron a la muestra 8 ml de cada tampón de "lisis y lavado" y se mezclaron durante 10 minutos. La muestra se centrifugó después a 1855 x *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y se desechó que se lavaba el sedimento resuspendiendo el sedimento en el mismo tubo con 5 ml de Triton™ X-100 3,4 g/l en medios BD Bactec Lytic 10 (número de catálogo 442265) sin cloruro de amonio. El sedimento resuspendido se dejó mezclar durante 5 minutos, seguido de centrifugación a 3000 rpm 1855 x *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se desechó, mientras que el sedimento se usó para la identificación por MADLI-TOF/MS y el ensayo Phoenix™ ID/AST como se desvela a continuación.

Una porción del sedimento bacteriano preparado anteriormente se resuspendió en un tubo de microcentrífuga que contenía 0,6 ml de agua desionizada estéril. Una porción de la suspensión (1 µl) se aplicó en forma de mancha en una placa objetivo MALDI-TOF/EM para el análisis de identificación bacteriana y se dejó secar al aire. Se superpuso ácido fórmico (1-2 µl de una solución acuosa al 70 %) sobre la muestra seca, manchada y se dejó secar al aire. La muestra seca se cubrió con 1 µl de solución de matriz MALDI-TOF/EM (solución de matriz MALDI-EM preparada disolviendo 2,5 mg de HCCA en 250 µl de ácido trifluoroacético al 2,5 % y acetonitrilo al 47,5 % en agua desionizada) y se dejó que secara al aire antes de la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF. Todos los datos de espectrometría de masas se registraron en un Bruker Microflex™ LT con el software Biotyper 2.0. Los métodos para preparar el sedimento microbiano aislado e identificar el microorganismo por espectrometría de masas se describen adicionalmente en la Solicitud de los Estados Unidos número 13/636.944, presentada el 31 de agosto de 2012, que se incorpora en el presente documento por referencia. Una puntuación de MALDI-TOF/EM mayor o igual a 2,0 indica la identificación a nivel de especie. Una puntuación de MALDI-TOF/EM de entre 1,7 y 1,999 indica la identificación a nivel de género. Y una puntuación MALDI-TOF/EM inferior a 1,7 indica que no hay identificación o la identificación no es fiable. Los resultados se resumen en la Tabla 2 a continuación. Un "sí" indica que se obtuvo una identificación correcta al menos a nivel de género, es decir, con una puntuación MALDI de al menos 1,7.

Una segunda porción de la suspensión preparada para MALDI-TOF/EM como se ha descrito anteriormente se diluyó adicionalmente con el caldo Phoenix™ ID hasta aproximadamente 0,5 McFarland y se usó para inocular un panel ESA Phoenix™ como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se resumen en la Tabla 2 a continuación. Para los resultados de ESA Phoenix™, un "sí" representa aquellas muestras que estaban en acuerdo esencial entre la muestra de control (colonias sembradas en placas), es decir, aquellas muestras con una diferencia de dilución de solo +1 o -1.

Tabla 2:

	Identificación por MALDI-TOF/EM	**ESA Phoenix™**
Tampón n.º 1 *E. faecium*	Sí	Sí
Tampón n.º 1 *E. faecalis*	Sí	Sí
Tampón n.º 1 *S. aureus*	Sí	Sí
Tampón n.º 1 P. *mirabilis*	Sí	Sí
Tampón n.º 2 *E. faecium*	Sí	Sí
Tampón n.º 2 *E. faecalis*	Sí	Sí
Tampón n.º 2 S. *aureus*	Sí	Sí
Tampón n.º 2 P. *mirabilis*	Sí	Sí
Tampón n.º 3 *E. faecium*	Sí	Sí
Tampón n.º 3 *E. faecalis*	Sí	Sí
Tampón n.º 3 S. *aureus*	Sí	Sí

Tampón n.º 3 P. *mirabilis*	Sí	Sí
Tampón n.º 4 *E. faecium*	Sí	Sí
Tampón n.º 4 *E. faecalis*	Sí	Sí
Tampón n.º 4 *S. aureus*	Sí	Sí
Tampón n.º 4 P. *mirabilis*	No	Sí
Total	15/16	16/16

Los resultados demuestran que pueden usarse diversos tampones de "lisis y lavado" para aislar microorganismos viables de una muestra de HCP para la identificación corriente abajo mediante espectrometría de masas y ensayos ESA en un panel de microorganismos.

Ejemplo 3

Se obtuvieron tres muestras de hemocultivo positivos inoculando un frasco de hemocultivo con *Enterococcus faecalis* (VRE ATCC 51299), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) o *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300). Se prepararon dos tampones de "lisis y lavado" diferentes que comprendían las formulaciones que se resumen en la Tabla 3 a continuación. La única diferencia entre el tampón n.º 1 y el tampón n.º 2 fue la adición de cloruro de amonio 16 g/l en el tampón n.º 2.

Tabla 3:

Tampón n.º 1	Caldo de soja Trypticase™ 27,5 g/l, HCl de L-cisteína 0,7 g/l, Tioglicolato de sodio 0,3 g/l, Saponina 2,6 g/l y Triton™ X-100 6,7 g/l.
Tampón n.º 2	Caldo de soja Trypticase™ 27,5 g/l, HCl de L-cisteína 0,7 g/l, Tioglicolato de sodio 0,3 g/l, Saponina 2,6 g/l, Triton™ X-100 6,7 g/l y Cloruro de amonio 16 g/l.

Se usó cada uno de los tampones de "lisis y lavado" de la Tabla 3 para preparar un sedimento microbiano de cada una de las tres muestras de HCP para un total de seis muestras preparadas. Se mezcló una porción de cada muestra de HCP (5 ml) con 5 ml de cada tampón de "lisis y lavado". Las muestras se centrifugaron a 2200 x *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y se desechó que el sedimento se lavaba resuspendiendo el sedimento en el mismo tubo con el mismo tampón de "lisis y lavado". El sedimento resuspendido se centrifugó a 2200 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se desechó, mientras que el sedimento se usó para la identificación de MALDI-TOF/EM y el ensayo ID/ESA Phoenix™ como se describe a continuación.

Una porción del sedimento bacteriano se resuspendió en un tubo de microcentrífuga que contenía 0,6 ml de agua estéril. Una porción de la suspensión (1 µl) se aplicó en forma de mancha en una placa objetivo de MALDI-TOF/EM para el análisis de identificación de bacterias como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se resumen en la Tabla 4 a continuación e indican si se obtuvo una identificación correcta al menos a nivel de género, es decir, con una puntuación MALDI de al menos 1,7. Una segunda porción de la suspensión preparada para la MALDI-TOF/EM anterior se diluyó adicionalmente con caldo Phoenix™ ID hasta aproximadamente 0,5 McFarland y se usó para inocular un panel Phoenix™ ID como se desvela en el Ejemplo 1. Los resultados se resumen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4:

	Identificación por MALDI-TOF/EM	**ESA Phoenix™**
Tampón n.º 1 *E. faecalis*	Sí	Sí
Tampón n.º 1 *K. pneumoniae*	Sí	Sí
Tampón n.º 1 S. *aureus*	Sí	Sí
Tampón n.º 2 *E. faecalis*	Sí	Sí
Tampón n.º 2 *K. pneumoniae*	Sí	Sí
Tampón n.º 2 *S. aureus*	Sí	Sí
Total	6/6	6/6

Los resultados demuestran que pueden usarse diversos tampones de "lisis y lavado", con o sin cloruro de amonio para aislar microorganismos viables de una muestra de HCP para su identificación corriente abajo en un panel de microorganismos.

Ejemplo 4

Se realizaron ensayos para determinar la viabilidad de varias cepas diferentes de *S. pneumoniae* tras la exposición a diversos tampones de "lisis y lavado" que se describen en el presente documento. Se realizaron ensayos adicionales para determinar si el procesamiento de una muestra de HCP con estos diversos tampones de "lisis y lavado" retira suficientemente las sustancias que interfieren con la identificación del microorganismo.

Viabilidad celular

Se prepararon tres tampones de "lisis y lavado" diferentes como se resume en la Tabla 5 a continuación, cada uno con una cantidad diferente de Triton™ X-100, es decir, 6,7 g/l, 0 g/l o 0,335 g/l.

Tabla 5:

Tampón n.º 1 (mucho Triton™ X100)	Caldo de soja Trypticase™ 27,5 g/l, HCl de L-cisteína 0,7 g/l, Tioglicolato de sodio 0,3 g/l, Saponina 2,6 g/l y Triton™ X-100 6,7 g/l.
Tampón n.º 2 (sin Triton™ X-100)	Caldo de soja Trypticase™ 27,5 g/l con glucosa, HCl de L-cisteína 0,7 g/l, Tioglicolato de sodio 0,3 g/l, Saponina 2,6 g/l
Tampón n.º 3 (poco Triton™ X-100)	Caldo de soja Trypticase™ 27,5 g/l con glucosa, HCl de L-cisteína 0,7 g/l, Tioglicolato de sodio 0,3 g/l, Saponina 2,6 g/l y Triton™ X-100 0,335 g/l.

Se inoculó un volumen de cada uno de estos tampones (10 ml) con 1 X 10^3 ufc/ml de la cepa no mucoide de *S. pneumoniae* (POS3092) o la cepa mucoide de *S. pneumoniae* (POS650) y se incubaron durante hasta cuatro horas. Como control positivo, también se inoculó un volumen de 10 ml de caldo nutritivo anaeróbico con cada una de las cepas de *S. pneumoniae*, ya que se esperaría que los microorganismos crecieran en este caldo nutritivo. Después de la inoculación en los puntos temporales de 0 horas, 1 hora, 2 horas y 4 horas, se sembró en placa un volumen de 100 µl de la mezcla en placas de agar que contenían un 5 % de sangre de oveja a una densidad de aproximadamente 1 X 10^2 ufc/placa. Las placas se incubaron durante la noche a 35 ºC/CO_2 al 5 %, momento en que las placas se contaron manualmente para determinar las colonias bacterianas. Los resultados del recuento manual de placas se resumen en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6:

	Tampón	**0 hora**	**1 hora**	**2 horas**	**4 horas**
S. pneumoniae no mucoide (POS3092)	n.º 1 (mucho)	23	0	0	0
	n.º 2 (sin)	82	105	125	101
	n.º 3 (poco)	105	100	70	31
	Caldo anaeróbico (Control)	149	130	98	113
	Tampón	**0 horas**	**1 hora**	**2 horas**	**4 horas**
S. pneumoniae mucoide (POS65Q)	n.º 1 (mucho)	10	0	0	0
	n.º 2 (sin)	28	37	19	17
	n.º 3 (poco)	36	38	33	28
	Caldo anaeróbico (Control)	70	67	74	57

Como se muestra en la Tabla 6, no se obtuvo *S. pneumoniae* viable después de una exposición de 1 hora a una alta concentración de Triton™ X-100 (tampón n.º 1). Sin embargo, se obtuvieron cantidades comparables de *S. pneumoniae* viable usando los tampones sin Triton™ X-100 (n.º 2) y con poco Triton™ X-100 (n.º 3).

Identificación por MALDI-TOF/EM

Los diversos tampones de "lisis y lavado" de la Tabla 5 se usaron para preparar un sedimento bacteriano a partir de una muestra de HCP para usar para la identificación por MALDI-TOF/EM para determinar si los diversos tampones de "lisis y lavado" limpiaron suficientemente la muestra de HCP de los residuos celulares interferentes. Las muestras

de HCP se prepararon con cinco cepas diferentes de *S. pneumoniae,* incluyendo la cepa no mucoide POS3092, la cepa no mucoide POS3996, la cepa no mucoide POS3999, la cepa mucoide POS650 y la cepa mucoide POS532 inoculando un frasco aeróbico y uno anaeróbico para cada una de las cepas. El microorganismo se aisló de cada una de las muestras de HCP usando cada uno de los tampones de "lisis y lavado" de la Tabla 5 añadiendo a cada muestra de HCP un volumen del tampón de lisado y lavado en una proporción de 1:1. Las mezclas se mezclaron en un Nutator™ durante 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 2200 x *g* durante 10 minutos, después se decantó y se descartó el sobrenadante. Para lavar el sedimento de los residuos de células sanguíneas, se añadieron 5 ml adicionales del mismo tampón de "lisis y lavado" al tubo y se agitaron con formación de vórtice para resuspender el sedimento. La mezcla se centrifugó a 2200 x *g* durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se retiró el exceso de líquido del sedimento microbiano resultante usando una torunda aplicadora de algodón. El sedimento microbiano se resuspendió en 600 µl de agua desionizada estéril para conseguir un inóculo de suspensión microbiana de aproximadamente 4 McFarland.

El sedimento resultante se preparó para la identificación por MALDI-TOF/EM mediante los métodos que se describen en el Ejemplo 2. Las puntuaciones de MADLI-TOF/EM se resumen en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7:

Tampón	***S. pneumoniae* no mucoide (PO5S3092)**	***S. pneumoniae* no mucoide (POS3996)**	***S. pneumoniae* no mucoide (POS3999)**	***S. pneumoniae* mucoide (POS650)**	**S. *pneumoniae* mucoide (POS532)**
Frasco aeróbico/ Tampón n.º 1 (mucho)	1,65	1,859	1,558	1,427	1,57
	1,71	1,647	1,442	1,516	1,371
	1,633	1,814	1,587	1,281	1,372
Frasco anaeróbico /Tampón n.º 2 (sin)	1,982	2,179	2,248	1,698	1,682
	0	2,251	2,143	0	1,782
	1,479	2,185	2,02	1,799	1,779
Frasco aeróbico/ Tampón n.º 2 (sin)	1,899	1,204	1,817	1,44	1,408
	1,594	1,338	1,837	1,377	1 345
	1,729	1,524	1,769	1,269	1,313
Frasco anaeróbico/ Tampón n.º 3 (poco)	1,983	2,286	2 .453	2,213	1,972
	1,891	2,309	2,441	2,066	2,085
	1,856	2,202	2,458	2,1	2,205
Frasco aeróbico/ Tampón n.º 3 (poco)	1,952	2,276	2,114	1,428	1,206
	2,002	1,971	2,253	1,415	1,375
	2,092	2,101	2,18	1,329	1,389

Los resultados indican que la preparación de un sedimento microbiano viable a partir de un frasco anaeróbico de HCP produjo puntuaciones de MALDI significativamente mejores para diversas cepas de *S. pneumoniae* en comparación con los sedimentos preparados a partir del frasco de HCP aeróbico. Además, los tampones de "lisis y lavado" que se describen en el presente documento que contienen cantidades bajas de Triton™ X-100 producen puntuaciones de MALDI significativamente mejores en todo el panel de cepas de *S. pneumoniae* en comparación con muestras preparadas con una alta concentración de Triton™ X-100.

Aunque la invención del presente documento se ha descrito con referencia a realizaciones particulares, ha de entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Por tanto, ha de entenderse que pueden realizarse numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que pueden diseñarse otras disposiciones sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un tampón para aislar y concentrar microorganismos viables de una muestra de hemocultivo positivo que comprende una solución base que comprende un caldo nutritivo; al menos un detergente no iónico que comprende saponina y tritón X-100; al menos un tiol; y opcionalmente, cloruro de amonio, en el que la concentración del caldo nutritivo en el tampón es de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 50 g/l, la concentración de los detergentes no iónicos en el tampón es de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 20 g/l, la concentración del al menos un tiol en el tampón es de aproximadamente 0,005 g/l a 4 g/l y la concentración del cloruro de amonio opcional en el tampón, si está presente, es de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 80 g/l, en el que las cantidades relativas de la solución base, el al menos un detergente no iónico y el al menos un tiol en el tampón se seleccionan para conservar la viabilidad de *S. pneumoniae*.

2. El tampón de la reivindicación 1, en el que la concentración de tritón X-100 en el tampón es de hasta aproximadamente 1 g/l.

3. El tampón de la reivindicación 1, en el que la solución base comprende adicionalmente un tampón isotónico, una peptona y una sal.

4. El tampón de la reivindicación 3, en el que el tampón isotónico comprende al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, solución salina tamponada con fosfato y solución salina, en el que la concentración de tampón isotónico en el tampón es de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 20 g/l.

5. El tampón de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un detergente no iónico seleccionado entre el grupo que consiste en la familia de detergentes Brij, octil-b-Glucósido, la familia Tergitol de detergentes, la familia CYMAL de detergentes, la familia MEGA de detergentes, la familia PLURONIC de detergentes y la familia CHAP de detergentes.

6. El tampón de la reivindicación 1, en el que el al menos un tiol se selecciona entre el grupo que consiste en HCl de L-cisteína, tioglicolato de sodio, mercaptoetilamina, ácido mercaptosuccínico, mercaptoetanol, ácido mercaptoetano sulfónico y tioglicerol.

7. El tampón de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente cloruro de amonio, en el que la concentración de cloruro de amonio en el tampón es de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 80 g/l.

8. El tampón de la reivindicación 1, en el que la solución base comprende caldo de soja tripticasa; y
el al menos un tiol comprende HCL de L-cisteína y tioglicolato de sodio.

9. El tampón de la reivindicación 1, en el que la solución base comprende adicionalmente peptona de caseína a una concentración en el tampón de aproximadamente 8 g/l a aproximadamente 35 g/l, cloruro de sodio a una concentración en el tampón de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 10 g/l, peptona de soja a una concentración en el tampón de aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 15 g/l y fosfato de potasio a una concentración en el tampón de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 5 g/l; y
el al menos un tiol comprende L-cisteína a una concentración en el tampón de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 2,5 g/l y tioglicolato de sodio a una concentración en el tampón de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 2,5 g/l.

10. El tampón de la reivindicación 1, en el que el tampón no contiene un agente antiespumante.

11. Un método para aislar y concentrar microorganismos viables de una muestra de hemocultivo positivo que comprende:
mezclar una porción de una muestra de hemocultivo positivo con el tampón de la reivindicación 1 para producir una mezcla, en la que la cantidad del tampón con respecto a la muestra de hemocultivo positivo es de manera que las células se lisen y se conserve la viabilidad del microorganismo en la muestra de hemocultivo positivo;
opcionalmente, incubar la mezcla;
centrifugar la mezcla para producir un sedimento y un sobrenadante;
descartar el sobrenadante conservando el sedimento;
resuspender el sedimento con el tampón para crear un sedimento resuspendido;
centrifugar el sedimento resuspendido para producir un segundo sobrenadante y un segundo sedimento; y
descartar el segundo sobrenadante conservando el segundo sedimento que contiene microorganismos viables.

12. El método de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente resuspender el segundo sedimento en una solución y realizar al menos un ensayo corriente abajo del segundo sedimento resuspendido seleccionado entre el grupo que consiste en la identificación del microorganismo mediante espectrometría de masas, identificación fenotípica, ensayos de susceptibilidad antimicrobiana y ensayos moleculares.

13. El método de la reivindicación 11, en el que el microorganismo se selecciona entre el grupo que consiste en bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y levaduras.

14. Un kit para aislar y concentrar microorganismos de una muestra de hemocultivo positivo que comprende al menos una formulación del tampón de la reivindicación 1.

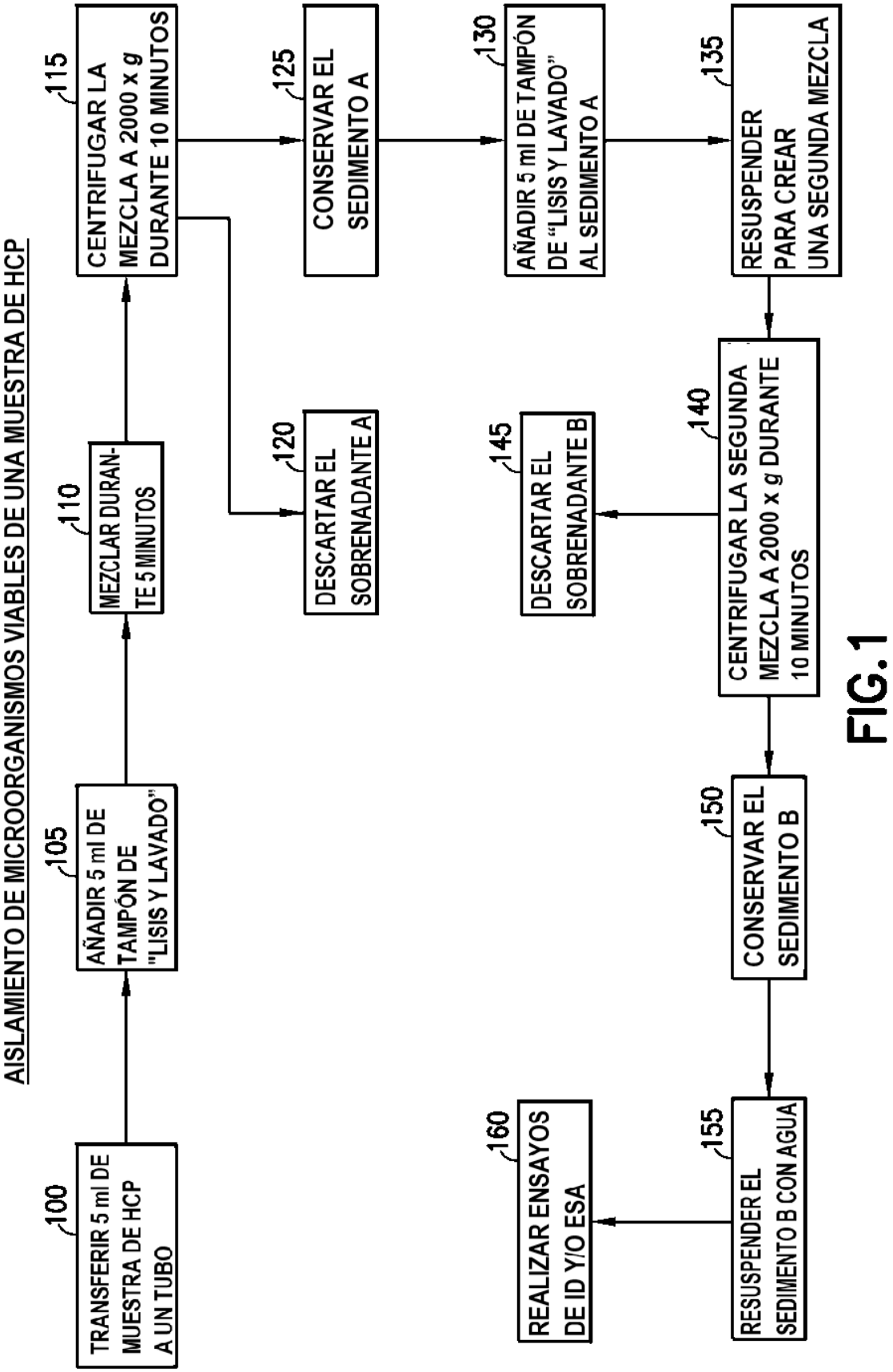
AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS VIABLES DE UNA MUESTRA DE HCP
100
TRANSFERIR 5 ml DE MUESTRA DE HCP A UN TUBO
105
AÑADIR 5 ml DE TAMPÓN DE "LISIS Y LAVADO"
110
MEZCLAR DURANTE 5 MINUTOS
115
CENTRIFUGAR LA MEZCLA A 2000 x g DURANTE 10 MINUTOS
120
DESCARTAR EL SOBRENADANTE A
125
CONSERVAR EL SEDIMENTO A
130
AÑADIR 5 ml DE TAMPÓN DE "LISIS Y LAVADO" AL SEDIMENTO A
135
RESUSPENDER PARA CREAR UNA SEGUNDA MEZCLA
140
CENTRIFUGAR LA SEGUNDA MEZCLA A 2000 x g DURANTE 10 MINUTOS
145
DESCARTAR EL SOBRENADANTE B
150
CONSERVAR EL SEDIMENTO B
155
RESUSPENDER EL SEDIMENTO B CON AGUA
160
REALIZAR ENSAYOS DE ID Y/O ESA

FIG. 1

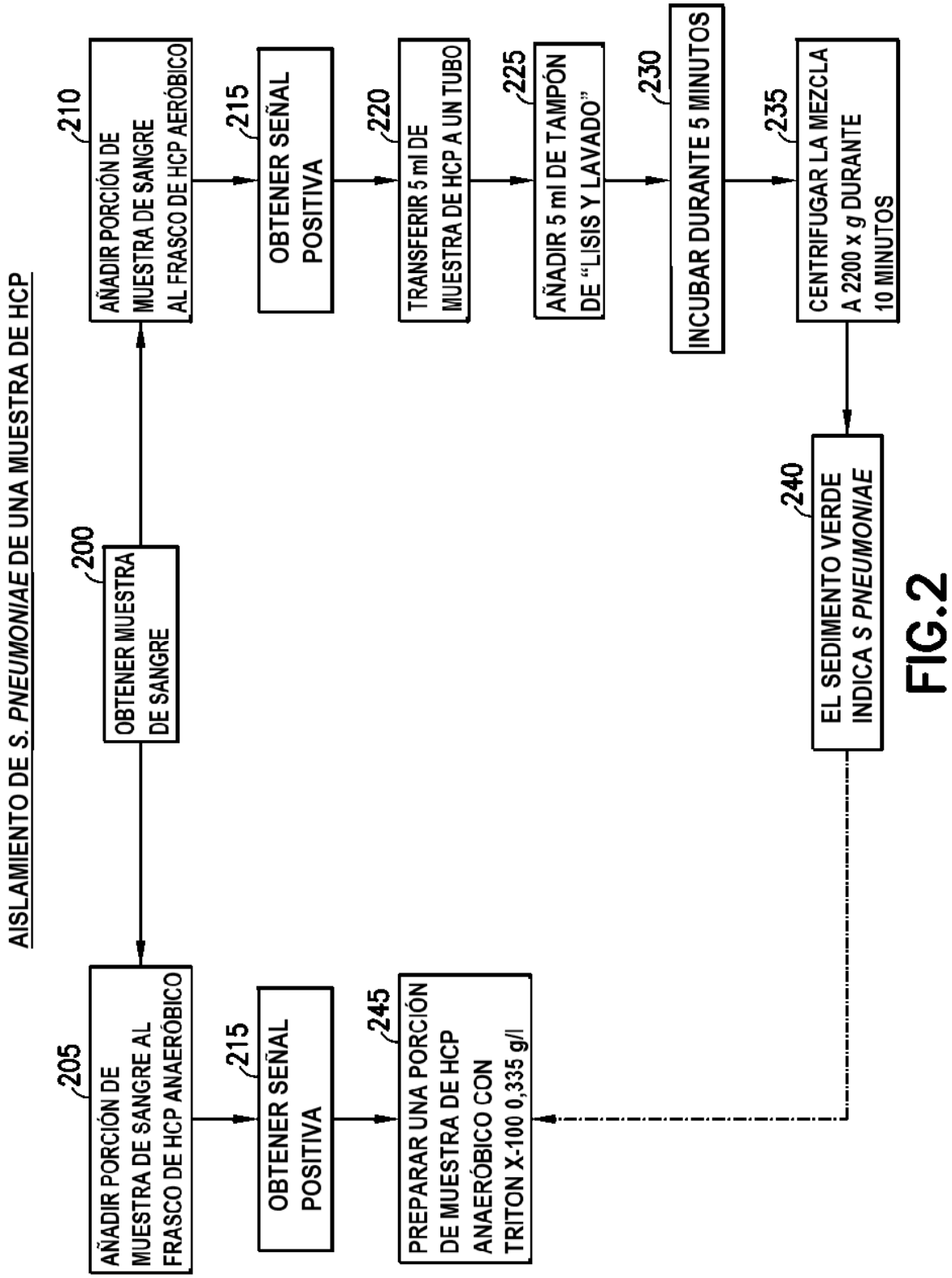
AISLAMIENTO DE S. PNEUMONIAE DE UNA MUESTRA DE HCP
200
OBTENER MUESTRA DE SANGRE
205
AÑADIR PORCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE AL FRASCO DE HCP ANAERÓBICO
210
AÑADIR PORCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE AL FRASCO DE HCP AERÓBICO
215
OBTENER SEÑAL POSITIVA
215
OBTENER SEÑAL POSITIVA
220
TRANSFERIR 5 ml DE MUESTRA DE HCP A UN TUBO
225
AÑADIR 5 ml DE TAMPÓN DE "LISIS Y LAVADO"
230
INCUBAR DURANTE 5 MINUTOS
235
CENTRIFUGAR LA MEZCLA A 2200 x g DURANTE 10 MINUTOS
240
EL SEDIMENTO VERDE INDICA S PNEUMONIAE
245
PREPARAR UNA PORCIÓN DE MUESTRA DE HCP ANAERÓBICO CON TRITON X-100 0,335 g/l

FIG.2