

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 630**

51 Int. Cl.:

G01N 33/483 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2013 PCT/US2013/059104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14040088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2013 E 13835702 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2893344**

54 Título: **Hemocultivo del mismo día con microscopia digital**

30 Prioridad:
10.09.2012 US 201261699191 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2020

73 Titular/es:
**ACCELERATE DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
3950 S. Country Club Road, Suite 470
Tucson, AZ 85714, US**

72 Inventor/es:
**METZGER, STEVEN W.;
HANCE, KENNETH ROBERT y
HOWSON, DAVID C.**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 744 630 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

Hemocultivo del mismo día con microscopia digital

5 Campo

La presente divulgación se refiere, en general, a métodos de cultivo rápido de microorganismos de muestras para facilitar la detección rápida de microorganismos. Más particularmente, la divulgación se refiere a métodos para hacer crecer el microorganismo en la muestra de hemocultivo con el fin de aumentar el número de microorganismos disponible para la detección, reduciendo al mismo tiempo la concentración de material en la muestra que puede interferir con la detección posterior de los microorganismos en la muestra.

Antecedentes

15 Los enfermos críticos que adquieren una infección del torrente sanguíneo deben comenzar el tratamiento con antibiótico adecuado lo más rápidamente posible. La necesidad de cultivo durante una noche crea un retardo inaceptable. Los métodos de cultivo rápido, combinados con los métodos de detección, tales como microscopia digital automatizada, ofrecen la posibilidad de obtención el mismo día, incluyendo la detección del organismo, la identificación y la caracterización de fenotipo de resistencia a fármacos, directamente de una muestra clínica tal como una muestra de sangre.

La bacteriemia debida a organismos resistentes a múltiples fármacos (MDRO) es cada vez más frecuente y está aumentando su complejidad. Para enfermos críticos, la resistencia puede hacer que el tratamiento inicial sea ineficaz, lo que retarda el inicio de un tratamiento antimicrobiano eficaz. El retardo también prolonga la exposición a tratamiento empírico de amplio espectro, creando una presión selectiva que favorece la resistencia incipiente. El documento WO2010062352 divulga un método que comprende mezclar una muestra de sangre con una combinación de un detergente, tal como saponina, enzimas, tales como proteinasas, y que incluye además agentes adicionales, tales como agentes reductores (por ejemplo, 2-mercaptoetanol o DTT), agentes tamponantes y agentes líticos. Los compuestos se añaden después del crecimiento celular.

Los métodos de cultivo rápido divulgados en el presente documento tienen el poder de reducir el tiempo de obtención facilitando el análisis de bacterias vivas directamente de una muestra clínica, lo que elimina la necesidad de etapas preliminares o preparativas de cultivo tales como producción de aislados de colonias o un hemocultivo positivo.

35 Sumario

La presente invención se refiere a un método, que comprende las etapas de:

- a) introducir un medio de cultivo, un agente lítico y una enzima de escisión de desechos celulares a una muestra de sangre que comprende eritrocitos y al menos una célula microbiana viva, en el que la introducción del agente lítico y la enzima de escisión de desechos celulares en la muestra de sangre degrada los eritrocitos para producir una concentración de hemo libre en la muestra de sangre, que puede reducir el crecimiento de la al menos una célula microbiana viva, en el que la muestra de sangre es un hemocultivo directo del paciente o un hemocultivo positivo;
- b) introducir una polimerasa de hemo a la muestra de sangre;
- c) incubar la muestra de sangre con el agente lítico y la enzima de escisión de desechos celulares y la polimerasa de hemo durante un periodo de tiempo para producir una muestra de sangre digerida;
- d) producir el crecimiento de la al menos una célula microbiana viva durante el periodo de tiempo para producir un número umbral de células microbianas vivas necesario para la identificación; y
- e) determinar la especie y/o cepa de al menos una de las células microbianas vivas usando microscopia digital automatizada.

La presente divulgación se refiere, en general, a métodos para el cultivo rápido de microorganismos en una muestra, y más específicamente, a métodos para el crecimiento y/o recuperación de células microbianas vivas directamente de una muestra. Como se expone en más detalle a continuación, diversas divulgaciones en el presente documento proporcionan avances sobre métodos de la técnica anterior, particularmente con respecto a producir crecimiento de microorganismos presentes en una muestra junto con una reducción en los desechos de la muestra que pueden interferir con la detección del microorganismo y efectos tóxicos que pueden inhibir el crecimiento del microorganismo. La divulgación en el presente documento incluye métodos para degradar selectivamente células microbianas no viables en una muestra durante un periodo de crecimiento para la detección de células microbianas viables después del periodo de crecimiento.

En un aspecto, la divulgación en el presente documento incluye métodos de obtención de una muestra clínica que tiene una muestra de sangre con una célula microbiana, dilución de una parte de la muestra clínica con un medio de cultivo para producir una muestra diluida, exposición de la muestra diluida a un periodo de crecimiento para producir un cultivo crecido y detección de la célula microbiana del cultivo crecido. En diversas partes de la divulgación, la

muestra clínica es un hemocultivo directo del paciente o un hemocultivo positivo. En diversos aspectos adicionales de la divulgación, se produce un aislado de colonias de la muestra clínica y/o el método se aplica directamente a la muestra clínica. En una parte adicional de la divulgación, el método también proporciona concentración del cultivo crecido. Se contemplan diversas técnicas de concentración, que incluyen concentración por centrifugación del cultivo crecido que tiene la célula microbiana y/o introducción de una alícuota del cultivo crecido a un canal de cubeta de lectura y concentración electrocinética de la célula microbiana en una superficie del canal de cubeta de lectura. En una realización adicional más, la etapa de detección se realiza usando una microscopia digital automatizada combinada. En una parte adicional de la divulgación, la etapa de detección incluye uno o más de detección del crecimiento clonal asociado a la célula microbiana, determinación de una identidad de la célula microbiana y determinación del fenotipo de resistencia antimicrobiana de la célula microbiana. Pueden determinarse dos (2) o más fenotipos de resistencia antimicrobiana. La divulgación en el presente documento incluye un método que se realiza en menos de ocho (8) horas, y la muestra de sangre incluye menos de aproximadamente 10 UFC/ml.

También se divulgan en el presente documento métodos de obtención de una muestra clínica que tiene una célula microbiana; introducción a la muestra clínica de uno o más de un medio de cultivo, un agente lítico a una concentración de agente lítico y una enzima de escisión de desechos a una concentración de enzima; e incubación de la muestra durante un primer periodo de tiempo para producir una muestra digerida que tiene desechos de la muestra. El primer periodo de tiempo incluye un tiempo mínimo para producir crecimiento de la célula microbiana para producir al menos un número umbral de células microbianas para la detección mediante un aparato de detección. El número umbral de células microbianas puede ser directamente proporcional a la concentración de desechos de la muestra y/o el tamaño de partículas de los desechos de la muestra. La concentración deseada de enzima de escisión de desechos puede ser la que produce una reducción en al menos uno de la concentración de desechos de la muestra y/o el tamaño de partículas de los desechos de la muestra y, opcionalmente, a una tasa que reduce la interferencia con la detección de células microbianas dentro del primer periodo de tiempo. La concentración de enzima de escisión de desechos preferiblemente no produce una condición de tasa de crecimiento de células microbianas reducida en el primer periodo de tiempo. En diversas partes de la divulgación, la enzima de escisión de desechos puede incluir una hidrolasa, tal como una proteasa, una peptidasa, una nucleasa, una lipasa, una amilasa, una glucosidasa, una glucanasa, y una hialuronidasa.

También se divulga en el presente documento un método de obtención de una muestra de sangre; introducción de un agente lítico y una proteasa a la muestra de sangre, donde la muestra de sangre contiene eritrocitos y una célula microbiana viva; introducción de un agente antitóxico a la muestra de sangre; e incubación de la muestra de sangre durante un primer periodo de tiempo para producir una muestra de sangre digerida. El método puede incluir la etapa de introducción de un agente antitóxico a la muestra de sangre. El agente antitóxico puede ayudar a evitar una reducción en una tasa de crecimiento de la célula microbiana viva y/o producir un aumento en la tasa de crecimiento. En diversos aspectos adicionales de la divulgación, el agente lítico y/o la proteasa degradan los eritrocitos para producir una concentración de hemo libre en la muestra. La concentración de hemo libre puede reducir la tasa de crecimiento de la célula microbiana viva. En diversos aspectos adicionales de la divulgación, se introduce un agente antitóxico de hemo a la muestra de sangre, incluyendo uno o más de una polimerasa de hemo, un antioxidante, un eliminador de radicales libres, un agente reductor, un agente tamponante, y un agente que inactiva uno o más antibióticos. El agente puede aumentar la tasa de formación de beta-hematina, la formación de agregados de hemo y/o la formación de agregados de hemo oligomérico.

Otra parte de la divulgación se refiere a la obtención de una muestra clínica, no limitada a una muestra de sangre; la realización de una hidrólisis con proteasa de las células microbianas dentro de la muestra; la incubación de la muestra durante un primer periodo de tiempo; y la detección de la presencia de una célula microbiana diana viva. La hidrólisis con proteasa es adecuada para degradar de forma selectiva células microbianas diana no viables, tales como desechos celulares y no celulares, incluyendo desechos de la muestra de sangre, en un primer periodo de tiempo.

Otra parte de la divulgación se refiere a un método de obtención de una muestra de sangre, e introducción de un agente lítico y una enzima de escisión de desechos, tal como una proteasa, a la muestra de sangre. La muestra de sangre puede contener células microbianas viables y células microbianas no viables. El agente lítico lisa las células sanguíneas produciendo desechos celulares de la sangre. El método incluye además incubar la muestra de sangre durante un primer periodo de tiempo, de modo que la enzima de escisión de desechos pueda degradar uno o más de los desechos celulares de la sangre, las células microbianas no viables y/o las células no diana. El método entonces incluye además detectar la presencia de células microbianas viables.

Otra parte de la divulgación se refiere a un método de preparación de una muestra clínica para producir una muestra; introducción de una parte de la muestra a un sistema de microscopia automatizado que incluye uno o más de un microscopio, un robot de pipeteo, un casete de fluidos multicanal y un analizador; detección de la presencia de un microorganismo vivo en la muestra clínica; y determinación de la identidad del microorganismo vivo en la muestra clínica. La etapa de detección de la presencia de un microorganismo vivo puede incluir la detección de un clon en crecimiento. La identidad del microorganismo vivo puede incluir el análisis de al menos cuarenta (40) clones en crecimiento. En otra parte más de la divulgación, el método comprende además determinar un fenotipo de resistencia a fármacos del microorganismo vivo por el sistema de microscopia automatizado.

Llevarán a ser evidentes áreas adicionales de aplicabilidad a partir de la descripción detallada proporcionada en el presente documento. Debe entenderse que la descripción y ejemplos específicos están destinados a fines ilustrativos únicamente y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención definida en las reivindicaciones.

5 Breve descripción de los dibujos

La materia objeto de la presente divulgación está particularmente indicada y reivindicada claramente en la parte concluyente de la memoria descriptiva. Una comprensión más completa de la presente invención, sin embargo, puede obtenerse mejor por referencia a la descripción detallada cuando se considera en relación con las figuras de dibujo, en las que números similares indican elementos similares y en las que:

la figura 1A es una vista en perspectiva de un casete desechable de 32 canales de acuerdo con diversas realizaciones;

la figura 1B es una vista superior de una cubeta de lectura individual de un casete de acuerdo con diversas realizaciones;

la figura 2 ilustra un flujo del proceso para cultivo rápido de muestras de sangre seguido de análisis de MADM;

la figura 3 muestra ejemplos de imágenes de campo oscuro durante 3 horas de crecimiento de los clones para SA sin fármaco, SA en 6 µg/ml de FOX, y para un bacilo gramnegativo (*E. coli*) sin fármaco para la morfología;

la figura 4A-1 muestra una imagen de campo oscuro de una muestra no digerida;

la figura 4A-2 muestra una imagen de campo oscuro de una muestra digerida con proteasa;

la figura 4B-1 muestra una imagen fluorescente de una muestra no digerida;

la figura 4B-2 muestra una imagen fluorescente de una muestra digerida con proteasa;

la figura 5 muestra el porcentaje relativo de objetos de campo oscuro totales detectados como *E. coli* por ensayo de FISH en la imagen fluorescente;

la figura 6A-1 muestra una imagen de campo oscuro de una muestra no digerida, no purificada;

la figura 6A-2 muestra una imagen de campo oscuro de una muestra no digerida, purificada;

la figura 6A-3 muestra una imagen de campo oscuro de una muestra digerida, no purificada;

la figura 6A-4 muestra una imagen de campo oscuro de una muestra digerida, purificada;

la figura 6B-1 muestra una imagen fluorescente de una muestra no digerida, no purificada;

la figura 6B-2 muestra una imagen fluorescente de una muestra no digerida, purificada;

la figura 6B-3 muestra una imagen fluorescente de una muestra digerida, no purificada;

la figura 6B-4 muestra una imagen fluorescente de una muestra digerida, purificada;

la figura 7 es un gráfico que muestra un aumento en las bacterias para las condiciones óptimas y de alta cantidad de proteasa en cada uno de los puntos temporales;

la figura 8A es un gráfico que muestra la concentración de bacterias detectada en un ensayo de FISH a las 1 y 4 horas frente a la concentración conocida con adiciones al inicio del ensayo para las condiciones de control del crecimiento de *P. aeruginosa* con y sin proteasa;

la figura 8B es un gráfico que muestra la concentración de bacterias detectada en un ensayo de FISH a las 1 y 4 horas frente a la concentración conocida con adiciones al inicio del ensayo para las condiciones de tratamiento con etanol de *P. aeruginosa* con y sin proteasa; y

la figura 8C es un gráfico que muestra la concentración de bacterias detectada en el ensayo de FISH a las 1 y 4 horas frente a la concentración conocida con adiciones al inicio del ensayo para las condiciones de tratamiento con gentamicina de *P. aeruginosa* con y sin proteasa.

45 Descripción detallada

La siguiente descripción es meramente de naturaleza a modo de ejemplo y no está destinada a limitar la presente invención, sus aplicaciones o sus usos. Debe entenderse que, a lo largo de todos los dibujos, los correspondientes números de referencia indican partes y elementos similares o correspondientes. La descripción de ejemplos específicos indicados en diversas realizaciones de la presente invención está destinada a fines ilustrativos únicamente y no está destinada a limitar el alcance de la invención divulgada en el presente documento. Además, la indicación de múltiples realizaciones que tengan elementos establecidos no está destinada a excluir otras realizaciones que tengan elementos adicionales u otras realizaciones que incorporen diferentes combinaciones de los elementos establecidos.

Además, la descripción detallada de diversas realizaciones en el presente documento hace referencia a las figuras de dibujo adjuntas, que muestran diversas realizaciones a modo de ilustración. Aunque las realizaciones se describen en suficiente detalle para posibilitar que los expertos en la materia pongan en práctica la invención, debe entenderse que pueden lograrse otras realizaciones y que pueden hacerse cambios lógicos y mecánicos sin alejarse del espíritu y alcance de la presente invención. Por tanto, la descripción detallada en el presente documento se presente con fines ilustrativos únicamente y no de limitación. Por ejemplo, las etapas o funciones indicadas en descripciones de cualquier método, sistema o proceso, pueden ejecutarse en cualquier orden y no están limitadas al orden presentado. Además, cualquiera de las etapas o funciones del mismo pueden delegarse a o realizarse por una o más terceras partes. Además, cualquier referencia al singular incluye realizaciones en plural, y cualquier referencia a más de un componente puede incluir una realización en singular.

La presente divulgación se refiere, en general, a métodos para el cultivo rápido de microorganismos en una muestra,

y más específicamente, a métodos para el crecimiento y/o recuperación de células microbianas vivas directamente de una muestra. Como se expone en más detalle a continuación, diversas realizaciones proporcionan avances sobre métodos de la técnica anterior, particularmente con respecto a producir crecimiento de microorganismos presentes en una muestra junto con una reducción en los desechos de la muestra que pueden interferir con la detección del microorganismo y efectos tóxicos que pueden inhibir el crecimiento del microorganismo.

Muestra

La presente divulgación proporciona métodos de detección de un microorganismo presente en una muestra clínica o muestra. Como se usa en el presente documento, las expresiones "muestra clínica" y "muestra" pueden usarse indistintamente. De acuerdo con diversas realizaciones, una muestra clínica puede comprender una muestra de incontables fuentes, tales como líquidos corporales (incluyendo, aunque sin limitación, sangre, orina, suero, líquido linfático, saliva, secreciones anales y vaginales, sudor, líquido peritoneal, líquido pleural, derrames, líquido ascítico, secreciones purulentas, líquidos de lavado, líquidos drenados, muestras de citología con cepillo, tejido de biopsia, dispositivos médicos explantados, catéteres infectados, pus, biopelículas y semen) de casi cualquier organismo. Aunque los métodos divulgados en el presente documento pueden ser de particular relevancia para las muestras obtenidas de una fuente biológica, otros tipos de muestras, tales como muestras ambientales (incluyendo, aunque sin limitación, aire, muestras agrícolas, agua y muestras de tierra) también pueden usarse en los métodos de la presente divulgación. Asimismo, pueden tomarse muestras del procesamiento de alimentos, que pueden incluir tanto muestras de entrada (por ejemplo, granos, leche o cadáveres de animales), muestras en etapas intermedias del procesamiento, así como alimentos acabados listos para el consumidor. El valor de los métodos divulgados en el presente documento para aplicaciones veterinarias debe apreciarse también, por ejemplo, con respecto a su uso para el análisis de leche en el diagnóstico y tratamiento de mastitis, o el análisis de muestras respiratorias para el diagnóstico de enfermedad respiratoria bovina.

Crecimiento

Como se usa en el presente documento, el término "crecimiento" puede incluir cualquier cambio medible atribuible a o que se produce en la vida de un organismo, sea que el cambio se produce en condiciones externas estáticas o en respuesta a un cambio en un evento o condición interna o externa. "Crecimiento" puede usarse para hacer referencia a uno o más cambios asociados a un único microorganismo, o crecimiento puede usarse para hacer referencia a un cambio neto o colectivo en un grupo, colección o población de organismos, sea que derivan de una única célula original o de múltiples células originales. "Crecimiento", en el caso de microorganismos que son células (por ejemplo, bacterias, protozoos y hongos) puede hacer referencia a un aumento en un atributo de un microorganismo, incluyendo atributos tales como masa, número de células, productos del metabolismo celular o cualquier otro atributo experimentalmente observable de un microorganismo.

Medio de cultivo

Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de cultivo" se usa para hacer referencia a un medio líquido o de gel usado para mantener el crecimiento de microorganismos. Por ejemplo, un medio de cultivo puede comprender un caldo nutriente o un medio nutriente líquido. También pueden usarse medios de gel o sólidos como medio de cultivo.

Agente lítico

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente lítico" se usa para describir cualquier compuesto químico o formulación que puede usarse para causar o contribuir a la lisis de una célula. De acuerdo con diversas realizaciones, la introducción de y/o incubación de un agente lítico con una muestra biológica o muestra clínica puede producir la lisis y/o alteración de las células presentes en la muestra. De acuerdo con diversas realizaciones y como se usa en el presente documento, introducir un agente lítico en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede provocar la lisis de células eucariotas presentes en la muestra biológica, incluyendo, por ejemplo, eritrocitos (es decir, glóbulos rojos), leucocitos (es decir, glóbulos blancos, incluyendo formas agranulocíticas y granulocíticas tales como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos y macrófagos), trombocitos (es decir, plaquetas) y similares. La introducción de un agente lítico a muestras obtenidas de otras fuentes puede asimismo alterar otros diversos tipos celulares que pueden estar presentes en una muestra. De acuerdo con diversas realizaciones, puede usarse un agente lítico que produzca selectivamente lisis de células eucariotas presentes en un tipo de muestra biológica particular sin lizar o inhibir de otro modo el crecimiento de células procariotas tales como células bacterianas que también pueden estar presentes en la muestra. La lisis de células en una muestra puede producir desechos de la muestra tales como fragmentos de la membrana celular y otros componentes celulares, como se explica en más detalle a continuación. En diversas realizaciones, un agente lítico también puede contribuir a la alteración, disolución y/o degradación de componentes celulares y desechos de la muestra que pueden estar presentes en una muestra después de la lisis celular.

De acuerdo con diversas realizaciones, un agente lítico puede comprender un detergente. En diversas realizaciones, un detergente puede ser un detergente no iónico o uno zwitteriónico. También pueden usarse detergentes iónicos de

acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación. Ejemplos de detergentes no iónicos que pueden usarse como agente lítico de acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación incluyen saponina, Tween-20, Triton X-100, NP-40 y similares. De acuerdo con diversas realizaciones, puede seleccionarse un agente lítico y/o una concentración de agente lítico que no sean tóxicos para una célula microbiana para el tratamiento de una muestra biológica. En otras realizaciones, puede seleccionarse un agente lítico y/o una concentración de agente lítico que proporcionen lisis eficaz y/o eliminación de los desechos de la muestra para una muestra biológica mientras produce una inhibición mínima del crecimiento de una célula microbiana en la muestra. Por ejemplo, puede seleccionarse un agente lítico y/o una concentración de agente lítico para un tipo de muestra particular y una especie de célula microbiana diana basándose en la compatibilidad predeterminada del agente lítico y/o la concentración de agente lítico con el crecimiento de la especie de célula microbiana diana y la lisis de los tipos de células eucariotas presentes en el tipo de muestra.

Escisión de desechos

De acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación, una muestra puede comprender desechos de la muestra. Como se usa en el presente documento, la expresión "desechos de la muestra" puede usarse para hacer referencia a células no microbianas, fragmentos celulares, componentes celulares y cualquier otro material particular o macromolecular celular o no celular que pueda estar presente en una muestra. De acuerdo con diversas realizaciones, puede haber desechos de la muestra presentes en una muestra o pueden producirse como resultado de la manipulación de la muestra o el procesamiento durante diversas etapas de los métodos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, la introducción de un agente lítico a una muestra de sangre puede producir lisis de los glóbulos sanguíneos presentes en la muestra, y la membrana celular y los contenidos celulares pueden comprender los desechos de la muestra. Como se usa en el presente documento, los desechos de la muestra también pueden comprender células no microbianas intactas o no lisadas, así como células microbianas no viables o componentes celulares.

De acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación, la presencia de desechos de la muestra puede interferir con una capacidad de recuperar y/o detectar células microbianas en la muestra. En diversas realizaciones y como se explica en mayor detalle a continuación, una o más enzimas, denominadas en el presente documento "enzimas de escisión de desechos", pueden introducirse a una muestra para escindir o degradar los desechos de la muestra. La escisión de desechos de la muestra (también denominada en el presente documento "digestión") puede reducir la concentración de desechos de la muestra y/o el tamaño de partículas de los desechos de la muestra de acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación.

De acuerdo con diversas realizaciones, una enzima de escisión de desechos puede comprender una enzima clasificada en el grupo 3 de la Comisión Internacional de Enzimas (EC 3), que incluye hidrolasas que catalizan la formación de dos productos a partir de un sustrato por hidrólisis. En diversas realizaciones, una hidrolasa usada como enzima de escisión de desechos puede comprender, por ejemplo, una proteasa, una peptidasa, una nucleasa, una amilasa, una glucosidasa, una glucanasa o una hialuronidasa. Combinaciones de diferentes enzimas de escisión de desechos, tales como proteasas con diferentes sitios de reconocimiento, o una combinación de una proteasa y una nucleasa, pueden usarse para realizar la escisión de desechos de acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación. En diversas realizaciones, una proteasa o una peptidasa puede comprender una exopeptidasa o una endopeptidasa. Ejemplos de proteasas que pueden usarse de acuerdo con diversas realizaciones incluyen Pronasa y Rozima. Otras hidrolasas que pueden usarse incluyen esterasas tales como lipasas (incluyendo fosfolipasa) y nucleasas (incluyendo exonucleasas y endonucleasas). En diversas realizaciones, pueden usarse nucleasas para disminuir la viscosidad de muestras respiratorias. Otras hidrolasas más pueden incluir glucósido hidrolasas tales como endoglucosidasas, exoglucosidasas, glucanasas, amilasas y hialuronidasas. En diversas realizaciones, pueden usarse glucósido hidrolasas para degradar la mucina en muestras respiratorias. Además de las hidrolasas, otras categorías de enzimas que catalizan otras categorías de reacciones de escisión de enlaces intramoleculares, tales como liasas (EC 4), también pueden usarse de acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación.

En diversas realizaciones, puede usarse un agente químico para proporcionar una función de escisión de desechos en lugar de o además de una enzima de escisión de desechos. De acuerdo con diversas realizaciones, pueden usarse diversos agentes químicos para escindir enlaces intramoleculares y producir digestión de los desechos de la muestra. Por ejemplo, bromuro de cianógeno, BNPS-escatol, ácido fórmico, hidroxilamina y ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico pueden usarse para escindir enlaces peptídicos. Cualquier agente químico que pueda usarse para reducir una concentración y/o un tamaño de partículas de desechos de la muestra puede usarse como agentes de escisión de desechos de acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación.

De acuerdo con diversas realizaciones, la degradación, la escisión o cualquier otra reducción en el tamaño de partículas de los desechos de la muestra a fragmentos o moléculas constituyentes más pequeñas puede producir que productos que pueden servir como nutrientes adicionales que pueden promover el crecimiento de un microorganismo.

Efectos tóxicos y agentes antitóxicos

Aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que el cultivo y/o crecimiento de microorganismos en diversas

condiciones puede producir condiciones químicas u otras condiciones en una muestra que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos. Asimismo, el tratamiento de una muestra, tal como digestión de la muestra mediante tratamiento con agente lítico y/o escisión de desechos puede producir también condiciones químicas u otras condiciones en la muestra que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos. Como se usa en el presente documento, una condición química u otra condición que puede inhibir el crecimiento de los microorganismos (es decir, producir una reducción en la tasa de crecimiento de un microorganismo) pueden denominarse de forma variada como toxina, condición tóxica o efecto tóxico. Asimismo, como se usa en el presente documento, un agente antitóxico puede ser cualquier tratamiento químico, enzimático u otro tratamiento que pueda reducir una condición tóxica, reducir o evitar una reducción en la tasa de crecimiento de un microorganismo, o producir un aumento en una tasa de crecimiento de un microorganismo.

De acuerdo con diversas realizaciones, el crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo que comprende una muestra de sangre, así como otras manipulaciones, tal como lisis y/o digestión proteolítica de una muestra de sangre o componentes de la muestra de sangre en un medio de cultivo, puede producir compuestos químicos o efectos que inhiban el crecimiento bacteriano. Asimismo, los compuestos químicos que pueden inhibir el crecimiento bacteriano pueden estar presentes en una muestra de sangre o producirse por una muestra de sangre. Por ejemplo, compuestos de radicales libres, compuestos acidificantes, hemo libre, antibióticos, factores inmunitarios del hospedador y similares, pueden estar presentes en una muestra de sangre, producirse durante la digestión de una muestra que comprende una muestra de sangre, o producirse durante el crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo que comprende una muestra de sangre.

De acuerdo con diversas realizaciones, una muestra puede comprender factores inmunitarios del hospedador. Los factores inmunitarios del hospedador pueden incluir componentes inmunitarios celulares y humorales tales como proteínas del complemento, anticuerpos y leucocitos que pueden inhibir el crecimiento microbiano. Los efectos de los factores inmunitarios del hospedador sobre el crecimiento microbiano pueden reducirse por tratamiento de la muestra con agentes antitóxicos tales como protectores, agentes líticos y proteasas. Por ejemplo, el polianetol sulfonato de sodio (SPS; Liquoid, Hoffman-La Roche) es un compuesto sintético que es un protector y un aditivo común en los medios de hemocultivo debido a sus propiedades anticoagulantes, anticomplemento y antifagocíticas. De acuerdo con diversas realizaciones, SPS puede servir para potenciar la tasa y velocidad de crecimiento bacteriano en un cultivo derivado de muestra de sangre contrarrestando determinados inhibidores bacterianos encontrados en la sangre humana.

En diversas realizaciones, los antibióticos presentes en el torrente sanguíneo de un paciente que experimenta tratamiento con antibióticos pueden estar presentes en una muestra de sangre en una concentración suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano sin destruir completamente las bacterias. De acuerdo con diversas realizaciones, una muestra de sangre y/o medio de cultivo que comprende una muestra de sangre puede tratarse con un agente antitóxico que inactiva el antibiótico, tal como carbón vegetal activado, resinas de intercambio iónico u otros agentes que se unen o neutralizan de otro modo el antibiótico.

De acuerdo con diversas realizaciones, la lisis de los glóbulos sanguíneos puede provocar la acidificación de un medio de cultivo, tal como mediante la liberación de protones desde lisosomas de los leucocitos. La acidificación de un medio de cultivo puede inhibir el crecimiento de diversas bacterias, tales como *Streptococcus pneumoniae*. En diversas realizaciones, puede añadirse un agente tamponante a un medio de cultivo para mantener un pH compatible con conseguir una tasa de crecimiento óptima de un microorganismo. Por ejemplo, puede añadirse tampón Tris a un medio de cultivo a una concentración de 1 mM a 10 mM para facilitar el mantenimiento de un pH estable durante la preparación de una muestra y/o la etapa de crecimiento bacteriano.

De acuerdo con diversas realizaciones, pueden producirse especies de oxígeno reactivas y otros compuestos de radicales libres durante un periodo de crecimiento y/o tratamiento de digestión. En diversas realizaciones, pueden introducirse compuestos antioxidantes y/o eliminadores de radicales libres a un medio de cultivo para reducir un efecto tóxico causado por la presencia de oxidantes y radicales libres. Por ejemplo, ácido ascórbico, carotenoides tales como beta-caroteno y tocoferoles tales como alfa-tocoferol, pueden añadirse a una muestra durante un periodo de crecimiento o digestión para reducir un efecto tóxico de especies de oxígeno reactivas, compuestos de radicales libres u otros oxidantes que pueden estar presentes en una muestra. En diversas realizaciones, puede añadirse un compuesto antioxidante a una concentración de 10 μ M a 1 mM. De acuerdo con diversas realizaciones, un agente antitóxico puede ser un antioxidante, un agente reductor o un eliminador de radicales libres. En diversas realizaciones, un eliminador de radicales libres puede ser un eliminador de radicales alquil peróxido.

Sobredigestión

Aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que la digestión con proteasa de componentes de hemocultivo puede producir productos de digestión que afectan negativamente al crecimiento de los microorganismos. En particular, se cree que los métodos divulgados en el presente documento pueden producir altas concentraciones de hemo libre como resultado de la lisis de la muestra de sangre y el proceso de digestión con proteasa. El hemo libre puede producirse por la lisis de eritrocitos y digestión de hemoglobina, liberando el hemo libre. Asimismo, concentraciones aumentadas de hemo libre en una muestra digerida con proteasa puede ser una función de la

digestión y/o la descomposición de otros componentes de la muestra de sangre que pueden servir para eliminar o interactuar de otro modo como con hemo libre, tal como seroalbúmina humana, hemopexina, lipocalina sérica α_1 -microglobulina y similares.

- 5 Aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que la presencia de hemo libre en los cultivos de sangre lisados y/o hidrolizados puede tener un efecto tóxico sobre, o puede inhibir de otro modo o tener un efecto reductor sobre, la tasa de crecimiento de determinados microorganismos que pueden estar presentes en el hemocultivo. Aunque los mecanismos de toxicidad por hemo son desconocidos y puede variar con la especie bacteriana, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación, una concentración creciente de hemo libre que puede producirse por la lisis y/o digestión de los componentes del hemocultivo hasta un nivel creciente de finalización por, por ejemplo, periodos de digestión con proteasa relativamente largos, digestión con proteasa con concentraciones relativamente altas de proteasa o similares, puede influir negativamente en la tasa de crecimiento de un microorganismo presente en el hemocultivo. De acuerdo con diversas realizaciones, la tasa de crecimiento de un microorganismo presente en un hemocultivo sometido a digestión con proteasa puede demostrar una reducción o disminución que depende de la misma y/o una función del tratamiento con proteasa. De acuerdo con diversas realizaciones, el efecto de una reducción dependiente de proteasa en la tasa de crecimiento puede no influir en la tasa de crecimiento de un microorganismo en un hemocultivo inmediatamente en la introducción de una proteasa al hemocultivo que comprende el microorganismo. Una reducción dependiente de proteasa en la tasa de crecimiento puede empezar a influir en la tasa de crecimiento de un microorganismo en un hemocultivo después de un periodo de tiempo después de la introducción de la proteasa al hemocultivo. El periodo de tiempo desde la introducción de la proteasa hasta un punto temporal en que una reducción dependiente de proteasa en la tasa de crecimiento puede empezar a afectar a la tasa de crecimiento de un microorganismo puede depender de la proteasa o proteasas particulares usadas para realizar la digestión con proteasa, la concentración de la proteasa, la duración de la digestión con proteasa, la concentración de sangre en la muestra, la variación individual en muestras de sangre, la temperatura a la que se realiza la digestión con proteasa, la presencia y concentraciones de otros componentes tales como detergentes, protectores, agentes reductores y similares.

Asimismo, el efecto de digestión con proteasa sobre la tasa de crecimiento de un microorganismo puede depender de la especie y/o cepa del microorganismo. Por ejemplo, suponiendo que la digestión con proteasa de un hemocultivo produce hemo libre, y que la presencia de hemo libre en un hemocultivo puede tener una influencia negativa sobre la tasa de crecimiento de diversos microorganismos, diferentes microorganismos pueden tener diferentes sensibilidades al hemo libre, tal como diferentes concentraciones umbral a las que el hemo libre empieza a ejercer una influencia negativa sobre el crecimiento o viabilidad de los microorganismos, así como diferencias en una magnitud de respuesta.

35 La concentración de enzima de la enzima de escisión de desechos puede ajustarse para optimizar una tasa de degradación de desechos de la muestra, incluyendo una tasa de reducción de la concentración de desechos de la muestra y/o una tasa de reducción del tamaño de partículas de los desechos de la muestra, de modo que la concentración de enzima no produzca una condición de una tasa de crecimiento de células microbianas reducida.

40 De acuerdo con la presente invención, se añade un agente antitóxico que comprende una polimerasa de hemo a una muestra para reducir un efecto tóxico de hemo libre en una muestra. Por ejemplo, el agente antitóxico aumenta una tasa de formación de agregados de hemo o formación de beta-hematina. En diversas realizaciones, la polimerasa de hemo puede ser resistente a proteasa.

45 **Umbral de detección**

De acuerdo con diversas realizaciones, la detección de células microbianas en una muestra puede realizarse usando un aparato de detección, sistema, método o una combinación de los mismos. En diversas realizaciones, la detección puede requerir un número umbral de células microbianas. La incubación de una muestra durante un primer periodo de tiempo puede ser necesaria para producir el crecimiento de una célula microbiana en una muestra para conseguir al menos un número umbral de células microbianas necesario para la detección por un aparato de detección, sistema o método. Asimismo, de acuerdo con diversas realizaciones, la identificación y ensayo de susceptibilidad antimicrobiana también pueden requerir un número umbral de células microbianas. El número umbral de células microbianas necesario para diversos análisis posteriores puede variar. Asimismo, el número de partida conocido o previsto de células microbianas en una muestra clínica, la tasa de crecimiento de una célula microbiana diana y otros factores pueden influir en el periodo de tiempo mínimo necesario para producir un nivel de crecimiento necesario para producir un número umbral de células.

60 De acuerdo con diversas realizaciones, la presencia de desechos de la muestra en una muestra puede influir en el número umbral de células microbianas necesario para la detección. En diversas realizaciones, al menos uno de una concentración de desechos de la muestra y un tamaño de partículas de los desechos de la muestra puede influir en el número de células microbianas necesario para la detección. Por ejemplo, la presencia de una alta concentración de desechos de la muestra y/o desechos de la muestra que tienen un tamaño de partículas grande puede interferir con la detección de células microbianas. De acuerdo con diversas realizaciones, un número umbral de células microbianas necesario puede ser directamente proporcional a al menos uno de una concentración de desechos de la muestra y un tamaño de partículas de los desechos de la muestra. Por ejemplo, la reducción de al menos uno de una concentración

de desechos de la muestra y un tamaño de partículas de los desechos de la muestra, tal como por digestión con una enzima de escisión de desechos, puede reducir un número umbral de células microbianas necesario para la detección. Asimismo, la reducción de un número umbral de células microbianas necesario para la detección debido a la digestión de desechos de la muestra puede reducir el periodo de tiempo necesario para producir crecimiento de una célula microbiana para que alcance el umbral de detección.

Ejemplo 1

Métodos

Se recogieron 29 alícuotas de 10 ml cada una de dos bolsas del banco de sangre de CPD poco llenas. Cada muestra recibió adiciones de aislado para generar en teoría 5 UFC/ml de las especies bacterianas diana. Estas incluían 14 *Staphylococcus aureus* (SA) y 3 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) más 12 bacilos gramnegativos no diana. Cada muestra se diluyó 4 veces para promover el crecimiento. La incubación a 35 °C durante 4 horas estuvo seguida de centrifugación, con resuspensión final en 1 ml de tampón electrocinético. Unos 16 canales de cubeta de lectura en un casete de fluidos multicanal recibieron cada uno 20 µl de muestra, seguido de 5 minutos de concentración electrocinética y captura superficial. Entonces se intercambiaron agar de Mueller-Hinton líquido (40 °C) con y sin antimicrobianos a través de cada canal y se gelificó. La microscopía automatizada adquirió imágenes a intervalos de 10 minutos durante 3 horas. El análisis de imágenes detectó crecimiento clonal, identificó SA y PA, y realizó simultáneamente ensayos de fenotipo de resistencia usando 32 µg/ml amikacina, 8 µg/ml de imipenem, 6 µg/ml ceftioxitina o 0,5 µg/ml de clindamicina. Los controles incluían cultivo cuantitativo, ensayos de difusión en disco para el fenotipo de resistencia del aislado y 20 muestras de sangre sin adiciones.

Resultados

Las muestras de sangre simuladas consistían en aislados añadidos a 10 ml cada uno de 29 alícuotas de sangre conservada para generar aproximadamente 5 UFC/ml, confirmados por cultivo cuantitativo. Los aislados añadidos incluían 14 *Staphylococcus aureus* (SA), 3 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) o 12 especies no diana. La dilución de cada muestra con 30 ml de medio de cultivo TSB modificado promovió el crecimiento. Unas 20 alícuotas de control adicionales no contenían adiciones. La incubación de 4 horas a 35 °C, seguida de una breve limpieza por centrifugación, finalizó con la resuspensión del sedimento en un tampón electrocinético para generar 1 ml. Entonces se pipetearon alícuotas de muestra de 20 µl en 14 cubetas de lectura del casete (figura 2). Un campo eléctrico de baja tensión de 5 minutos concentró las bacterias en la superficie inferior de cada cubeta de lectura donde un recubrimiento de captura inmovilizó las células bacterianas.

El sistema de MADM usó un microscopio y robot de pipeteo adaptados, más un programa de análisis de imágenes y control de experimento adaptado. Casetes desechables de 32 canales (figura 1) posibilitaron la inmovilización de células microbianas vivas para microscopía e intercambios de líquidos para diferentes agentes de ensayo. El microscopio barrió 40 campos de imagen en cada canal de cubeta de lectura, teniendo cada canal organismos extraídos de aproximadamente 3,5 µl de inóculo preparado.

El sistema adquirió imágenes de campo oscuro cada 10 minutos. El analizador aplicó algoritmos de identificación a cada célula inmovilizada individual que mostraba crecimiento. Unos 6 canales proporcionaron datos para los algoritmos de ID para puntuar organismos individuales y sus clones de la descendencia. Las variables de ID incluían la morfología celular, la morfología de crecimiento del clon, la tasa de crecimiento del clon y otros factores. El analizador calculó la probabilidad de ID basándose en el número de clones relacionados y sus puntuaciones.

La detección de organismos requirió ≥ 4 clones en crecimiento (GC). La recuperación produjo recuentos de GC de SA que excedían las UFC determinadas por cultivo, a causa de una alteración de masas casi completa en la mayoría de las muestras. El recuento combinó los resultados de múltiple canales cuando era apropiado. La identificación requirió ≥ 40 GC, y cada ensayo de fenotipo requirió ≥ 40 GC. La MADM detectó crecimiento en 29/29 muestras con adición y nada de crecimiento en 20/20 controles sin adición. El crecimiento suficiente para ID se produjo en 23/29 muestras. Unas 4 muestras de SA formaron grumos excesivamente, impidiendo la puntuación de ID. Unas 2 muestras de PA crecieron demasiado lentamente ($< 1,1$ div/h) hasta conseguir 40 GC en el periodo de crecimiento de 4 horas fijado (5 horas serían suficiente). Las tasas de crecimiento de SA fueron $\geq 1,5$ div/h. MADM identificó 1/1 PA y 10/10 SA. Se produjo una ID de PA falsa de las 22 muestras no diana para producir un 100 % de sensibilidad y un 97 % de especificidad. La ID falsa fue atribuible a una aberración de imagen conocida, posteriormente corregida.

La figura 3 muestra ejemplos de imágenes de campo oscuro durante 3 horas de crecimiento de los clones para SA sin fármaco, SA en 6 µg/ml de FOX, y para un bacilo gramnegativo (*E. coli*) sin fármaco para la comparación de morfología.

MADM presentó resistencia a fármacos en 19/20 muestras adecuadas con un MSSA falso, produciendo un 89 % de sensibilidad y un 100 % de especificidad. La tabla 1 resume los datos de SA para la concordancia global con resultados de comparación.

Este estudio piloto planteó si patógenos principales crecen suficientemente rápido para posibilitar el ensayo de

diagnóstico del mismo día directamente con muestras de sangre bacterémicas usando microscopia. MADM previamente había analizado pequeños números de células microbianas vivas extraídas de otros tipos de muestra. Este estudio demostró que 4 horas de crecimiento en un medio nutriente común proporciona suficientes clones vivos para análisis por MADM con células de crecimiento rápido ($> 1,1$ div/h de tasa de crecimiento en las condiciones ensayadas). PA requirió tiempos ligeramente más largos para ensayo adecuado, estimados en 5 horas. Estos resultados proporcionan parámetros para determinar los requisitos para aplicación práctica. Dado el número de GC requerido para un ensayo (40 con el prototipo de estudio), el número de ensayos, y el crecimiento de organismo diana más lento, el cálculo directo derivado de la duración de crecimiento mínima necesaria. El tiempo de cambio más rápido posible resulta de maximizar la tasa de crecimiento mientras se minimizan los GC necesarios para el ensayo, y se minimiza el número requerido de ensayos y su duración.

En 8 horas partiendo con sangre, la microscopia automatizada identificó satisfactoriamente patógenos diana y detectó fenotipos de resistencia a fármacos para una especie principal de células bacterianas vivas extraídas directamente de un pequeño volumen de sangre bacterémica simulada. El análisis diagnóstico usando métodos de células vivas individuales posibilita el cambio rápido sin requerir en primer lugar aislados de colonias. La puntuación de identificación probabilística consiguió una alta concordancia con resultados de laboratorio clínico. El análisis de fenotipo de resistencia también consiguió alta concordancia. Esta estrategia analítica también puede usar respuestas de clones individuales para identificar subpoblaciones de organismos y fenotipos de resistencia dentro de muestras polimicrobianas.

MADM posibilita en análisis diagnóstico de células microbianas vivas extraídas después de un breve crecimiento en medio de cultivo.

TABLA 1

Concordancia de resultados para MADM y resultados de comparación.			
IDENTIFICACIÓN (crecimiento adecuado N = 23)			
<i>S. aureus</i>	Neg. verdadero	Pos. verdadero	Precisión
MADM-Pos	0	10	Sensibilidad 100 % (CI 66-100 %)
MADM-Neg	23	0	Especificidad 100 % (CI 72-100 %)
FENOTIPO: MRSA (crecimiento adecuado N = 10)			
<i>S. aureus</i>	Neg. verdadero	Pos. verdadero	Precisión
MADM-Pos	0	4	Sensibilidad 80 % (CI 30-100 %)
MADM-Neg	5	1	Especificidad 100 % (CI 46-100 %)
FENOTIPO: CLI-R (crecimiento adecuado N = 10)			
<i>S. aureus</i>	Neg. verdadero	Pos. verdadero	Precisión
MADM-Pos	0	4	Sensibilidad 100 % (CI 40-100 %)
MADM-Neg	6	0	Especificidad 100 % (CI 52-100 %)

Ejemplo 2

Efecto del ajuste de la concentración de proteasa para una muestra de mayor concentración celular en la digestión sobre la concentración de desechos de la muestra

Introducción

La concentración de enzima puede optimizarse para hidrolizados más cortos o más largos para acomodar diferentes requisitos para el análisis de muestra. Muestras de alta concentración de bacterias similares a las tomadas de frascos de hemocultivo positivo pueden procesarse con mayor concentración de proteasa para un periodo de tiempo más corto para posibilitar análisis rápido. Para dicho análisis, se requiere crecimiento mínimo ya que las bacterias están en concentración suficiente sin crecimiento. Sin embargo, puede desearse algo de eliminación de desechos para permitir la visualización de bacterias vivas usando técnicas de campo oscuro en intervalo de tiempo u otras técnicas de imágenes. Este experimento ilustra un método para detectar las bacterias dentro del campo de desechos usando hibridación de fluorescencia *in situ*, usando la comparación de imágenes de campo oscuro y fluorescentes para determinar los objetos que son bacterias.

Métodos

Se creó una muestra de hemocultivo simulado mediante la adición de 10 ml de sangre a un frasco BioMerieux BacT/Alert Standard Aerobic. Una parte de 1,0 ml de esta muestra se usó para cada condición. Cada muestra se trató con saponina hasta una concentración final de 4 mg/ml y SPS hasta una concentración final de 0,96 mg/ml. Entonces a las muestras se les añadieron bacterias *S. aureus* hasta una concentración final de 1×10^6 ufc/ml. Las muestras se

trataron con una solución que contenía 2 mg/ml (diluida en caldo de soja tréptico) o un volumen equivalente de caldo de soja tréptico para el control sin hidrolizar. Las muestras se incubaron a 35 °C con agitación durante 1 hora. Cada muestra se procesó para retirar los desechos y se intercambiaron con el tampón de concentración electrocinético usando lavado por centrifugación. Las muestras se añadieron a los pocillos de un casete de microfluidos que tiene una parte superior conductora y portaobjetos conductor y se concentraron e inmovilizaron en la superficie de portaobjetos recubierta con poli-L-lisina aplicando 1,5 V durante 5 minutos. Los pocillos se lavaron con solución salina tamponada con tris y después las células se permeabilizaron para tinción de FISH usando una combinación de enzimas lisozima y lisostafina durante 5 minutos seguido de tratamiento con etanol al 80 % durante 5 minutos. Se usaron sondas de FISH marcadas con fluorocromo adaptadas dirigidas a secuencias específicas en el ARNr 16S de *S. aureus* para sondear las muestras permeabilizadas durante 10 minutos usando condiciones rigurosas. La hibridación fue seguida de lavados de 2-5 minutos con tampón de lavado riguroso. Se tomaron imágenes de las muestras teñidas para el análisis de desechos por fluorescencia y campo oscuro para visualizar las bacterias dentro del campo de desechos.

Resultados

La tabla 2 muestra los resultados de imágenes de campo oscuro y fluorescentes para cada una de las condiciones. Los datos se presentan como el porcentaje de los objetos totales en campo oscuro detectados como células teñidas en la imagen fluorescente. La muestra no digerida contenía una cantidad significativa de desechos que era igual en intensidad y sobrepasaba las bacterias en más de 10 a 1. La muestra digerida contenía menos objetos de desecho de igual intensidad a las bacterias. Las figuras 4A-1, 4A-2, 4B-1 y 4B-2 muestran las imágenes de campo oscuro y fluorescentes para estas condiciones, que muestran la reducción de desechos resultante del tratamiento con proteasa. Las imágenes son de 200 por 200 micrómetros, recortadas de imágenes de campo completo de visión. La concentración reducida de desechos de la muestra de la muestra digerida con proteasa redujo la interferencia con la visualización de las bacterias en el modo de imagen de campo oscuro. Este experimento demuestra que, dada una mayor concentración celular, el tratamiento con proteasa puede ser eficaz en reducir los desechos en un corto periodo de tiempo usando una mayor concentración de enzima que la optimizada para un periodo de crecimiento y digestión de 4 horas que puede ser necesario para aumentar los números de células hasta un nivel detectable a partir de una muestra de menor concentración celular.

TABLA 2

Comparación de detección de células microbianas por FISH después de digestión con proteasa.		
Condición	Objetos totales en campo oscuro	Células de <i>S. aureus</i> detectadas por FISH como un porcentaje de objetos totales detectados
Tratado con proteasa	2393	4,9 %
No tratado	10254	2,0 %

Ejemplo 3

Digestión con proteasa con concentración por centrifugación de bacterias y detección de FISH basada en portaobjetos convencional

Determinados métodos de detección no son susceptibles al análisis de la muestra sin purificación adicional. La tinción de FISH basada en portaobjetos es dicho ensayo, cuando la muestra no purificada se seca en un portaobjetos como es típico con los métodos publicados en frascos de hemocultivo positivo. Este ejemplo ilustra un método en que una única etapa de centrifugación es suficiente para retirar desechos sanguíneos residuales, purificando las bacterias para el análisis y permitiendo la visualización de bacterias usando únicamente imágenes de campo oscuro.

Se creó una muestra de hemocultivo simulado mediante la adición de 10 ml de sangre a un frasco BioMerieux BacT/Alert Standard Aerobic. Una parte de 1,0 ml de esta muestra se usó para cada condición. Cada muestra se trató con saponina hasta una concentración final de 4 mg/ml y SPS hasta una concentración final de 0,96 mg/ml. Entonces a las muestras se les añadieron bacterias *E. coli* hasta una concentración final de 1×10^4 ufc/ml. Las muestras se trataron con una solución que contenía 0,2 mg/ml (diluida en caldo de soja tréptico) o un volumen equivalente de caldo de soja tréptico para el control sin hidrolizar. Las muestras se incubaron a 35 °C con agitación durante 4 horas. Una parte de cada muestra se retiró para el análisis de las muestras no purificadas. La parte restante de cada muestra se centrifugó durante 4 minutos a 8000 x g y los sobrenadantes se retiraron. El sedimento que contiene desechos y bacterias se resuspendió con un volumen de tampón histidina 1 mM hasta alcanzar el volumen precentrifugación. Una parte de 20 microlitros de cada muestra no purificada y purificada se secó en un pocillo de un portaobjetos silanizado de 8 pocillos a 52 °C. El portaobjetos se procesó para tinción de FISH usando sondas de FISH de *E. coli* específicas. En resumen, *E. coli* se permeabilizó por tratamiento con etanol al 80 % durante 5 minutos y después se secó. Se usaron sondas de FISH marcadas con fluorocromo adaptadas dirigidas a secuencias específicas en el ARNr 16S de *E. coli* para sondear las muestras permeabilizadas durante 10 minutos usando condiciones rigurosas. La hibridación fue seguida de un único lavado de 10 minutos con tampón de lavado riguroso.

Para el análisis, el portaobjetos se secó y después se montó para imágenes fluorescentes. Las imágenes se tomaron usando un microscopio automatizado que en primer lugar tomó imágenes de campo oscuro y después realizó

imágenes de fluorescencia en el sitio. Las imágenes se recogieron para las siguientes condiciones:

- No digerida, no purificada;
- No digerida, purificada por un lavado por centrifugación;
- 5 • Digerida, no purificada; y
- Digerida, purificada por un lavado por centrifugación.

Las imágenes se analizaron usando un algoritmo de detección de partículas automatizado que busca objetos similares en tamaño y perfil de brillo a las bacterias. El algoritmo analiza tanto imágenes de campo oscuro como fluorescentes y rechaza artefactos tales como píxeles calientes, efectos de borde, burbujas y partículas de desecho grandes. El algoritmo entonces determina si los objetos están teñidos, comparando los objetos fluorescentes detectados y los objetos de campo oscuro en una superposición. La tinción fluorescente se presenta para objetos que cumplen una señal de pico mínima en relación con el fondo local usando la relación de señal a ruido. En general, los objetos deben mostrar una señal fluorescente relativa al menos 1,1 veces por encima del fondo local para que sea positiva.

La tabla 3 muestra el número de objetos y porcentaje relativo de objetos detectados como células de *E. coli* en la imagen fluorescente. La figura 5 proporciona una representación gráfica del porcentaje relativo de objetos teñidos basándose en la tabla 3. Las imágenes de las figuras 6A-1 a 6A-4 muestran imágenes de campo oscuro para las condiciones, mientras que las figuras 6B-1 a 6B-4 muestran las correspondientes imágenes fluorescentes. Las imágenes revelaron que las muestras no purificadas estaban en gran medida recubiertas con desechos residuales de sangre y materiales de la matriz y que el grado de carga de desechos fue similar para las muestras digeridas y no digeridas. Después de la purificación por centrifugación, la muestra no digerida mostró una cantidad reducida, pero significativa de desechos, algunos de los cuales provocaban un fondo fluorescente aumentado, limitando algo la capacidad de detectar las células de *E. coli* teñidas. Por el contrario, la muestra digerida y purificada estaba sustancialmente libre de desechos y mostraba fluorescencia fuerte, muy clara de las células de *E. coli*.

En conclusión, este experimento demuestra que la digestión con proteasa seguida de una etapa de centrifugación proporcionaba beneficios significativos para la detección de bacterias en un formato de FISH basado en portaobjetos.

TABLA 3

Portaobjetos de <i>E. coli</i> teñido con cóctel de sonda ECO/EUB.				
Purificado	Proteasa	Objetos totales	Células totales teñidas	Porcentaje de objetos totales teñidos
No	Sí	3326	579	17,4 %
Sí	Sí	234	212	90,6 %
No	No	4614	58	1,3 %
Sí	No	2312	153	6,6 %

Ejemplo 4

Inhibición del crecimiento bacteriano dependiente de tratamiento con proteasa en hemocultivo rápido

Muestras de hemocultivo se trataron con dos concentraciones diferentes de proteasa para determinar si la proteasa usada a una alta concentración podría producir inhibición del crecimiento bacteriano. La identificación de un efecto inhibitor dependiente de la concentración de proteasa sobre la tasa de crecimiento de células microbianas es un componente importante de optimización de un método de hemocultivo rápido. El crecimiento de *E. coli* en hemocultivos bacterémicos simulados tratados con una concentración de proteasa de trabajo (0,2 mg/ml) y alta concentración de proteasa (20 mg/ml) se comparó sobre un periodo de crecimiento y digestión de seis (6) horas.

Métodos

Se creó una muestra de hemocultivo simulado mediante la adición de 10 ml de sangre a un frasco BioMerieux BacT/Alert Standard Aerobic. Una parte de 1,0 ml de esta muestra se usó para cada condición. Cada muestra se trató con saponina hasta una concentración final de 4 mg/ml y SPS hasta una concentración final de 0,96 mg/ml. Entonces a las muestras se les añadieron bacterias *E. coli* hasta una concentración final de 1×10^2 ufc/ml. Las muestras se trataron con una solución de Pronasa que contenía 0,2 mg/ml o 20 mg/ml. Las muestras se incubaron a 35 °C con agitación durante 6 horas. Una parte de cada muestra se retiró para la determinación de la concentración en puntos temporales de 2 horas durante la incubación. Las bacterias muestreadas se sembraron en placa en series de dilución de factor 10 para determinar la concentración de bacterias en cada punto temporal. Las tasas de crecimiento intervalo a intervalo, la tasa de crecimiento global, y el aumento factorial frente a la concentración de partida se determinaron usando las concentraciones calculadas en cada punto temporal.

Resultados

La tabla 4 muestra los recuentos de placas para el experimento junto con las concentraciones calculadas para cada

muestra en cada punto temporal. La tabla 5 muestra los resultados de este experimento, que indican que las bacterias *E. coli* mostraban una disminución marcada en la tasa de crecimiento durante cada intervalo con la mayor concentración de proteasa, provocando un aumento global aproximadamente 8,5 veces inferior durante la incubación de 6 horas, lo que indica que la proteasa estaba optimizada para el crecimiento de bacterias a 0,2 mg/ml y que una concentración mayor de proteasa puede ser perjudicial para el crecimiento bacteriano. La figura 7 presenta gráficamente el aumento relativo con las concentraciones de proteasa óptima y alta, que muestran el crecimiento inhibido con la concentración alta.

En conclusión, la concentración de proteasa óptima debe usarse para obtener tasas de crecimiento óptimas dentro de un contexto de muestra dado.

TABLA 4

Resultados de siembra en placa y concentraciones calculadas de bacterias para cada muestra en los puntos temporales muestreados.						
Tiempo	Proteasa	Recuentos de placas de 30 ul				Conc. (ufc/ml)
		Sin diluir	1/10	1/100	1/1000	
2 h	Baja	7	0	0	0	$2,3 \times 10^2$
2 h	Alta	8	0	0	0	$2,7 \times 10^2$
4 h	Baja	TMTC*	41	6	0	$1,4 \times 10^4$
4 h	Alta	TMTC	37	1	0	$1,2 \times 10^4$
6 h	Baja	TMTC	TMTC	TMTC	67	$2,2 \times 10^6$
6 h	Alta	TMTC	TMTC	78	5	$2,6 \times 10^5$
*TMTC - demasiadas para contarlas						

TABLA 5

Tasas de crecimiento calculadas para cada intervalo de crecimiento, tasa de crecimiento calculada global sobre la ejecución de 6 horas y aumento factorial calculado sobre el número de partida de bacterias para cada muestra					
Proteasa	0 → 2 horas	2 → 4 horas	4 → 6 horas	Tasa global	Crecimiento factorial
Baja	0,60	2,96	3,65	2,40	22 000
Alta	0,70	2,74	2,22	1,89	2600

Ejemplo 5

Digestión con proteasa diferencial y detección de microorganismos vivos en comparación con microorganismos destruidos con antibiótico y etanol

Determinados ensayos para la detección rápida de bacterias soportan la presencia de bacterias muertas en la muestra, que provoca detección positiva falsa que a menudo no tiene correlación clínica con el estado patológico. Este puede ser el caso cuando las muestras se obtiene de pacientes que experimentan tratamiento satisfactorio con antibióticos. Un método para detectar de forma diferencial únicamente las bacterias vivas sería útil para reducir la detección de positivos falsos. El uso de tratamiento con proteasa de muestras de hemocultivo en un formato de hemocultivo rápido se investigó para determinar si el tratamiento con proteasa podría facilitar la diferenciación de células microbianas vivas de células microbianas muertas por eliminación de la detección de positivos falsos de células muertas debido a digestión diferencial con proteasa de células muertas. El ensayo de tinción de FISH se usó para determinar si las células muertas podrían producir una señal positiva falsa y si el tratamiento con proteasa eliminaría la detección positiva falsa. Como el proceso de FISH emplea fijación con etanol y calentamiento, se sabe que destruye las bacterias y, por tanto, debe poder detectar células intactas independientemente del estado viable al final del periodo de incubación.

Métodos

Se suspendieron bacterias de 4 especies diferentes en solución a alta concentración (10^7 ufc/ml) y después se trataron usando el antibiótico gentamicina a 100 microgramos por ml durante 1 hora para destruirlas. Un conjunto paralelo de bacterias a la misma concentración se trató con etanol al 80 % para producir un conjunto destruido que fuera independiente de la sensibilidad a antibiótico. Finalmente, un tercer conjunto de bacterias no se trató y sirvió como controles vivos. Las muestras de cada cepa y cada tratamiento se sembraron en placa para determinar la concentración de bacterias vivas. Alícuotas de cada preparación descrita anteriormente se añadieron en medio de caldo de soja tríptico o el mismo medio que contenía 0,2 mg/ml de Pronasa para obtener una suspensión al equivalente de 10^5 ufc/ml. Las muestras se incubaron a 35 °C durante 4 horas. En el punto de 1 hora y a las 4 horas, una parte de cada muestra se retiró para el análisis de FISH. Las muestras se centrifugaron para intercambiar el tampón a tampón de concentración electrocinético. Una parte de cada muestra se añadió a una cubeta de lectura de un casete de microfluidos que tenía superficies superior y de portaobjetos conductoras. Las células se concentraron e inmovilizaron

en la superficie del portaobjetos recubierto de poli-1-lisina mediante 1,5 V aplicados durante 5 minutos. Las cubetas de lectura se lavaron con solución salina tamponada con tris y las células se permeabilizaron por tratamiento con etanol al 80 % 4 5 minutos (*E. coli*, *K. pneumoniae*, y *P. aeruginosa*) o tratamiento con lisozima + lisostafina durante 5 minutos seguido de tratamiento con etanol al 80 % durante 5 minutos (*S. aureus*). Después de la permeabilización, cada cubeta de lectura se sondeó con una sonda de FISH específica según lo apropiado para la especie de interés durante 10 minutos en condiciones rigurosas. La sonda no unida se retiró usando lavados rigurosos de 2-5 minutos y se tomaron imágenes de la tinción para detectar la señal de FISH.

La tabla 6 muestra los datos de recuento de placas y las concentraciones calculadas de la ejecución. Estos resultados indicaron que *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* se destruían sustancialmente en 1 hora en gentamicina, pero que un número significativo de *S. aureus* permanecía vivo en esta condición. Todas las cepas tratadas con etanol al 80 % mostraron ausencia de células viables por siembra en placa. Las concentraciones calculadas de células vivas en los controles a T = 0 fueron casi 1×10^5 ufc/ml para todas las cepas. La tabla 7 presenta los datos del ensayo de FISH para el punto temporal de 1 hora y la tabla 8 muestra los resultados para el criterio de valoración de 4 horas. Se usó un umbral de detección de 1×10^4 células por ml como el umbral para una calificación positiva en el ensayo de FISH. En el punto temporal de 1 hora, *E. coli* y *P. aeruginosa* tratadas con etanol no se detectaban con el tratamiento con proteasa, pero habrían tenido calificación positiva en la condición no digerida. Todos los controles de gentamicina y vivos se detectaron independientemente de la digestión con proteasa. En el punto temporal de 4 horas posterior, se detectó un nivel mucho mayor de células en los controles vivos, mientras que ninguna de las concentraciones tratadas con gentamicina o etanol aumentaron frente al punto de 1 hora. Este resultado indicó que las células vivas detectadas por siembra en placa en T = 0 pueden haber muerto durante el periodo de incubación. El tratamiento con proteasa eliminó las células positivas falsas en gentamicina únicamente para *P. aeruginosa*, pero disminuyó los positivos falsos tratados con etanol en *E. coli* y *P. aeruginosa*. *K. pneumoniae* tratada con gentamicina fue negativa para condiciones tratadas y no tratadas, lo que indica que esta tratamiento provoca la descomposición de la integridad celular sin proteasa necesaria. *S. aureus* puede requerir tratamientos adicionales para permitir que la digestión de células muertas elimine la detección de positivos falsos. Las figuras 8A, 8B y 8C presentan gráficamente los resultados para la detección de *P. aeruginosa* usando el ensayo de FISH.

En conclusión, el tratamiento con proteasa puede proporcionar un medio de diferenciación de organismos vivos y muertos presentes en la muestra cuando el formato de análisis no proporciona suficiente discriminación de organismos vivos y muertos. Pueden necesitarse métodos de tratamiento alternativos para determinados tipos de organismos para proporcionar discriminación de muerto-vivo. **Resultados**

TABLA 6

Resultados de recuento de placas y concentraciones calculadas para las diversas condiciones						
Cepa	Condición	Tiempo	Dilución	Recuento	Conc. (ufc/ml)	Cantidad añadida (ufc)
Ecol 35218	GC	0 h	1/1000	90	9×10^5	9×10^4
Ecol 35218	Gent	0 h	Sin diluir	1	10	1
Ecol 35218	EtOH	0 h	Sin diluir	0	< 10	< 1
Kpne 13882	GC	0 h	1/1000	120	1×10^6	1×10^5
Kpne 13882	Gent	0 h	Sin diluir	6	60	6
Kpne 13882	EtOH	0 h	Sin diluir	0	< 10	< 1
Paer 27853	GC	0 h	1/1000	84	8×10^5	8×10^4
Paer 27853	Gent	0 h	Sin diluir	2	20	2
Paer 27853	EtOH	0 h	Sin diluir	0	< 10	< 1
Saur 12600	GC	0 h	1/1000	133	1×10^6	1×10^5
Saur 12600	Gent	0 h	Sin diluir	200	2×10^3	200
Saur 12600	EtOH	0 h	Sin diluir	0	< 10	< 1

TABLA 7

Resultados de FISH y concentraciones calculadas de células resultantes de la ejecución en el punto de muestreo de 1 hora.					
Cepa	Condición	Proteasa	FISH positiva	Conc.(células/ml)	¿Detección positiva?
Ecol 35218	Control	Sí	687	$2,3 \times 10^6$	Sí
Ecol 35218	Control	No	689	$2,3 \times 10^6$	Sí
Ecol 35218	Gentamicina	Sí	165	$5,5 \times 10^5$	Sí
Ecol 35218	Gentamicina	No	263	$8,8 \times 10^6$	Sí
Ecol 35218	Etanol	Sí	1	$3,3 \times 10^3$	No
Ecol 35218	Etanol	No	13	$4,3 \times 10^4$	Sí
Kpne 13882	Control	Sí	23	$7,7 \times 10^4$	Sí
Kpne 13882	Control	No	54	$1,8 \times 10^5$	Sí
Kpne 13882	Gentamicina	Sí	23	$7,7 \times 10^4$	Sí

Resultados de FISH y concentraciones calculadas de células resultantes de la ejecución en el punto de muestreo de 1 hora.					
Cepa	Condición	Proteasa	FISH positiva	Conc.(células/ml)	¿Detección positiva?
Kpne 13882	Gentamicina	No	52	1,7 x 10 ⁵	Sí
Kpne 13882	Etanol	Sí	204	6,8 x 10 ⁵	Sí
Kpne 13882	Etanol	No	147	4,9 x 10 ⁵	Sí
Paer 27853	Control	Sí	27	9,0 x 10 ⁴	Sí
Paer 27853	Control	No	80	2,7 x 10 ⁵	Sí
Paer 27853	Gentamicina	Sí	16	5,3 x 10 ⁴	Sí
Paer 27853	Gentamicina	No	111	3,7 x 10 ⁵	Sí
Paer 27853	Etanol	Sí	2	6,7 x 10 ³	No
Paer 27853	Etanol	No	90	3,0 x 10 ⁵	Sí
Saur 12600	Control	Sí	488	1,6 x 10 ⁶	Sí
Saur 12600	Control	No	270	9,0 x 10 ⁵	Sí
Saur 12600	Gentamicina	Sí	32	1,1 x 10 ⁵	Sí
Saur 12600	Gentamicina	No	42	1,4 x 10 ⁵	Sí
Saur 12600	Etanol	Sí	76	2,5 x 10 ⁵	Sí
Saur 12600	Etanol	No	102	3,4 x 10 ⁵	Sí

TABLA 8

Resultados de FISH y concentraciones calculadas de células en el criterio de valoración de 4 horas del ensayo					
Cepa	Condición	Proteasa	Recuento de tinción en FISH	Conc.(células/ml)	¿Detección positiva?
Ecol 35218	Control	Sí	5342	1,8 x 10 ⁷	Sí
Ecol 35218	Control	No	4365	1,5 x 10 ⁷	Sí
Ecol 35218	Gentamicina	Sí	136	4,5 x 10 ⁵	Sí
Ecol 35218	Gentamicina	No	144	4,8 x 10 ⁵	Sí
Ecol 35218	Etanol	Sí	2	6,7 x 10 ³	No
Ecol 35218	Etanol	No	11	3,7 x 10 ⁴	Sí
Kpne 13882	Control	Sí	1296	4,3 x 10 ⁶	Sí
Kpne 13882	Control	No	1398	4,7 x 10 ⁶	Sí
Kpne 13882	Gentamicina	Sí	5	1,7 x 10 ⁴	Sí
Kpne 13882	Gentamicina	No	0	< 1 x 10 ³	No
Kpne 13882	Etanol	Sí	84	2,8 x 10 ⁵	Sí
Kpne 13882	Etanol	No	122	4,1 x 10 ⁵	Sí
Paer 27853	Control	Sí	1758	5,9 x 10 ⁶	Sí
Paer 27853	Control	No	3500	1,2 x 10 ⁷	Sí
Paer 27853	Gentamicina	Sí	2	6,7 x 10 ³	No
Paer 27853	Gentamicina	No	90	3,0 x 10 ⁵	Sí
Paer 27853	Etanol	Sí	0	< 1 x 10 ³	No
Paer 27853	Etanol	No	38	1,3 x 10 ⁵	Sí
Saur 12600	Control	Sí	12505	4,2 x 10 ⁷	Sí
Saur 12600	Control	No	9162	3,1 x 10 ⁷	Sí
Saur 12600	Gentamicina	Sí	9	3,0 x 10 ⁴	Sí
Saur 12600	Gentamicina	No	9	3,0 x 10 ⁴	Sí
Saur 12600	Etanol	Sí	35	1,2 x 10 ⁵	Sí
Saur 12600	Etanol	No	57	1,9 x 10 ⁵	Sí

Ejemplo 6

5

La tabla 9 proporciona ejemplos de varias clases de bacterias con ejemplos de tratamientos que podrían usarse para diferenciar bacterias vivas y muertas usando un ensayo de detección no discriminado tal como FISH como se demuestra en el ejemplo 5. Esta tabla sugiere tratamientos que en primer lugar permeabilizan las bacterias, permitiendo la entrada de proteasa no específica en la célula para completar la digestión. Por ejemplo, se sabe que *S. aureus* tiene una envuelta relativamente impermeable compuesta de una capa de peptidoglucano gruesa reticulada con péptidos resistentes a muchas peptidasas. La peptidasa lisostafina escinde específicamente esta estructura peptídica y permeabilizará una célula de *S. aureus*. Debe entenderse que las condiciones de permeabilización, incluyendo la concentración de enzima y el tiempo de digestión, tendrían que optimizarse para evitar la permeabilización de bacterias vivas, ya que estas células tendrían capacidad de algún nivel de resistencia a estas enzimas. Como las bacterias muertas no pueden remodelar sus envueltas, la condición de permeabilización

10

15

optimizada abriría permanentemente el interior de la célula, permitiendo que la proteasa u otra enzima acceda a las estructuras internas para degradar las estructuras diana para el ensayo o liberar los contenidos de la célula muerta, evitando la detección. Puede necesitarse una combinación de permeabilización y agentes de digestión para eliminar suficientemente las células muertas, mientras se permite la detección de células vivas usando el ensayo del criterio de valoración.

5

TABLA 9

Tratamientos sugeridos para la discriminación de bacterias vivas y muertas para determinadas clases					
Clase de bacterias	Especia de ejemplo	Tratamiento para la permeabilización	Ejemplo(s)	Tratamiento de digestión	Ejemplo(s)
Bacterias gramnegativas	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Ninguno		Enzima proteasa no específica	Pronasa Rozima Proteinasa K
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Enzima peptidasa específica	Lisostafina	Enzima proteasa no específica	Pronasa Rozima Proteinasa K
<i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Enzima muramidasa específica	Lisozima	Enzima proteasa no específica	Pronasa Rozima Proteinasa K

Ejemplo 7

10

La tabla 10 presenta ejemplos de diferentes clases de bacterias que podrían requerir diferentes intervalos de crecimiento para alcanzar niveles detectables para un ensayo posterior. La tabla contempla diferentes concentraciones de enzima Pronasa para usar para diferentes periodos de incubación basándose en la tasa de crecimiento de las bacterias de interés. Asimismo, las concentraciones esperadas de bacterias pueden diferir basándose en el tipo de muestra y, por tanto, requerirían diferentes regímenes de tratamiento y periodos de incubación para alcanzar umbrales para la detección. El ajuste de la concentración de enzima permite el nivel apropiado de digestión para la reducción de desechos sin inhibir el crecimiento bacteriano. En el caso de un crecimiento lento de *P. aeruginosa* (1,0 a 1,5 div/h) partiendo con una concentración moderada de células (100 a 1000 ufc/ml) tal como podría originarse en una herida, la biopsia requeriría una concentración moderada de Pronasa para reducir los desechos durante las 4 horas requeridas para que las bacterias crezcan hasta una concentración detectable. La misma especie originada a partir de una muestra de concentración mayor, tal como una muestra respiratoria, puede requerir únicamente 1 hora en una concentración de enzima mayor para digerir los desechos sin la necesidad de crecimiento. El tiempo de muestra y el tipo esperado de bacterias pueden usarse para predecir las condiciones necesarias para obtener reducción óptima de desechos y crecimiento hasta el nivel detectable.

25

TABLA 10

Condiciones de ejemplo para el crecimiento y digestión para diferentes tipos de bacterias.				
Tipo de bacterias	Tasa de crecimiento normal (div/h)	Carga bacteriana de partida	Concentración de enzima (ejemplo para Pronasa)	Tiempo de incubación necesario para alcanzar el umbral de 10 ⁴ ufc/ml
Bacterias gramnegativas resistentes (<i>E. coli</i>)	2,0-2,5	1-10 ufc/ml	0,02 mg/ml	7 horas
		100 a 1000 ufc/ml	0,2 mg/ml	4 horas
		> 10 000 ufc/ml	2 mg/ml	1 hora
Bacterias gramnegativas lentas (<i>P. aeruginosa</i>)	1,0-1,5	1-10 ufc/ml	0,01 mg/ml	14 horas
		100 a 1000 ufc/ml	0,2 mg/ml	4 horas
		> 10 000 ufc/ml	2 mg/ml	1 hora
Bacterias grampositivas lentas	0,5 a 1,0	1-10 ufc/ml	0,005 mg/ml	27 horas
		100 a 1000 ufc/ml	0,01 mg/ml	14 horas
		> 10 000 ufc/ml	2 mg/ml	1 hora

Se cree que la divulgación expuesta anteriormente abarca al menos una invención distinta con utilidad independiente. Aunque la invención se ha divulgado en las formas a modo de ejemplo, las realizaciones específicas de la misma como se divulga y se ilustra en el presente documento no deben considerarse en un sentido limitante, ya que son posibles numerosas variaciones. Cambios equivalentes, modificaciones y variaciones de diversas realizaciones, materiales, composiciones y métodos pueden hacerse dentro del alcance de la presente divulgación, con resultados sustancialmente similares. La materia objeto de las invenciones incluye todas las combinaciones novedosas y no obvias y subcombinaciones de los diversos elementos, características, funciones y/o propiedades divulgados en el presente documento y sus equivalentes.

30

35

Los métodos descritos en el presente documento pueden implementarse para facilitar el cultivo rápido y detección de

células microbianas de muestras. Se han descrito beneficios, otras ventajas y soluciones a problemas en el presente documento con respecto a realizaciones específicas. Sin embargo, los beneficios, ventajas, soluciones a problemas y cualquier elemento o combinación de elementos que pueda causar que cualquier beneficio, ventaja o solución se produzca o llegue a ser más pronunciado, no tienen que interpretarse como características o elementos críticos, necesarios o esenciales de alguna o todas las reivindicaciones de la invención. Pueden hacerse muchos cambios y modificaciones dentro del alcance de la presente invención sin alejarse del espíritu de la misma, y la invención incluye todas estas modificaciones. Las correspondientes estructuras, materiales, actos y equivalentes de todos los elementos de las reivindicaciones siguientes están destinados a incluir cualquier estructura, material o acto para realizar las funciones en combinación con otros elementos de la reivindicación reivindicados específicamente. El alcance de la invención debe determinarse por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes legales, en lugar de por los ejemplos dados anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un método, que comprende las etapas de:

- 5 a) introducir un medio de cultivo, un agente lítico y una enzima de escisión de desechos celulares en una muestra de sangre, que comprende eritrocitos y al menos una célula microbiana viva, en donde la introducción del agente lítico y la enzima de escisión de desechos celulares en la muestra de sangre degrada los eritrocitos para producir una concentración de hemo libre en la muestra de sangre, que puede reducir el crecimiento de la al menos una célula microbiana viva, en donde la muestra de sangre es un hemocultivo directo del paciente o un hemocultivo positivo;
- 10 b) introducir una polimerasa de hemo a la muestra de sangre;
- c) incubar la muestra de sangre con el agente lítico y la enzima de escisión de desechos celulares y la polimerasa de hemo durante un periodo de tiempo para producir una muestra de sangre digerida;
- 15 d) producir el crecimiento de la al menos una célula microbiana viva durante el periodo de tiempo para producir un número umbral de células microbianas vivas necesario para la identificación; y
- e) determinar la especie y/o cepa de al menos una de las células microbianas vivas usando microscopia digital automatizada.

20 2. El método de la reivindicación 1, en el que la enzima de escisión de desechos celulares comprende una hidrolasa adecuada para degradar los desechos de la muestra de sangre.

3. El método de la reivindicación 2, en el que la hidrolasa comprende una proteasa.

25 4. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre es polimicrobiana.

5. El método de la reivindicación 1, en el que la microscopia digital automatizada comprende microscopia digital automatizada combinada.

30 6. El método de la reivindicación 1, que comprende además introducir una parte de la muestra de sangre digerida a un sistema de microscopia digital automatizada, que comprende un microscopio, un robot de pipeteo, un casete de fluidos multicanal, y un analizador para determinar la identidad de la al menos una célula microbiana viva en la muestra de sangre.

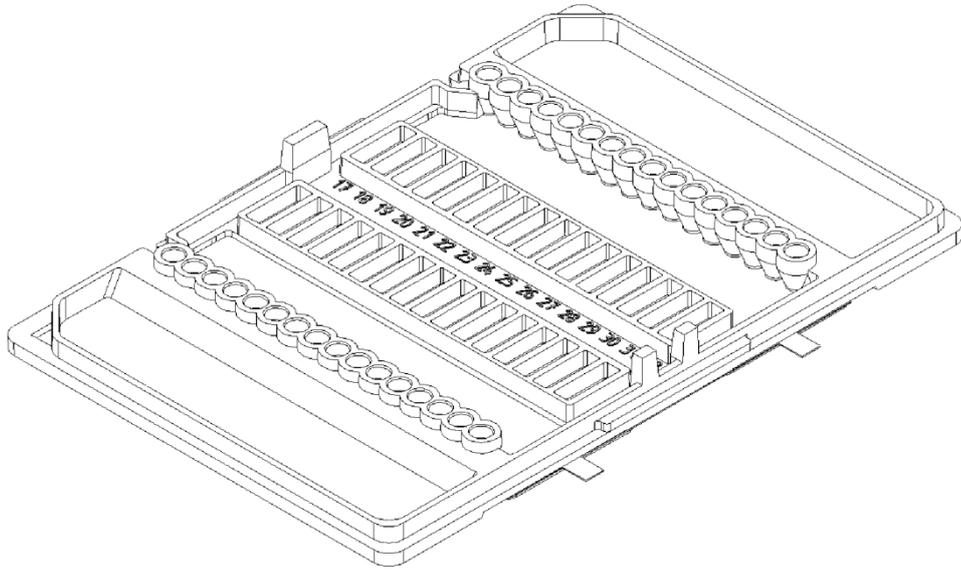


FIG. 1A

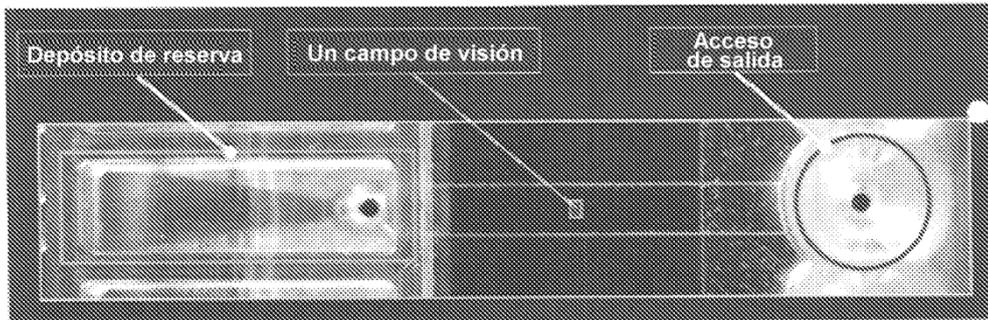


FIG. 1B

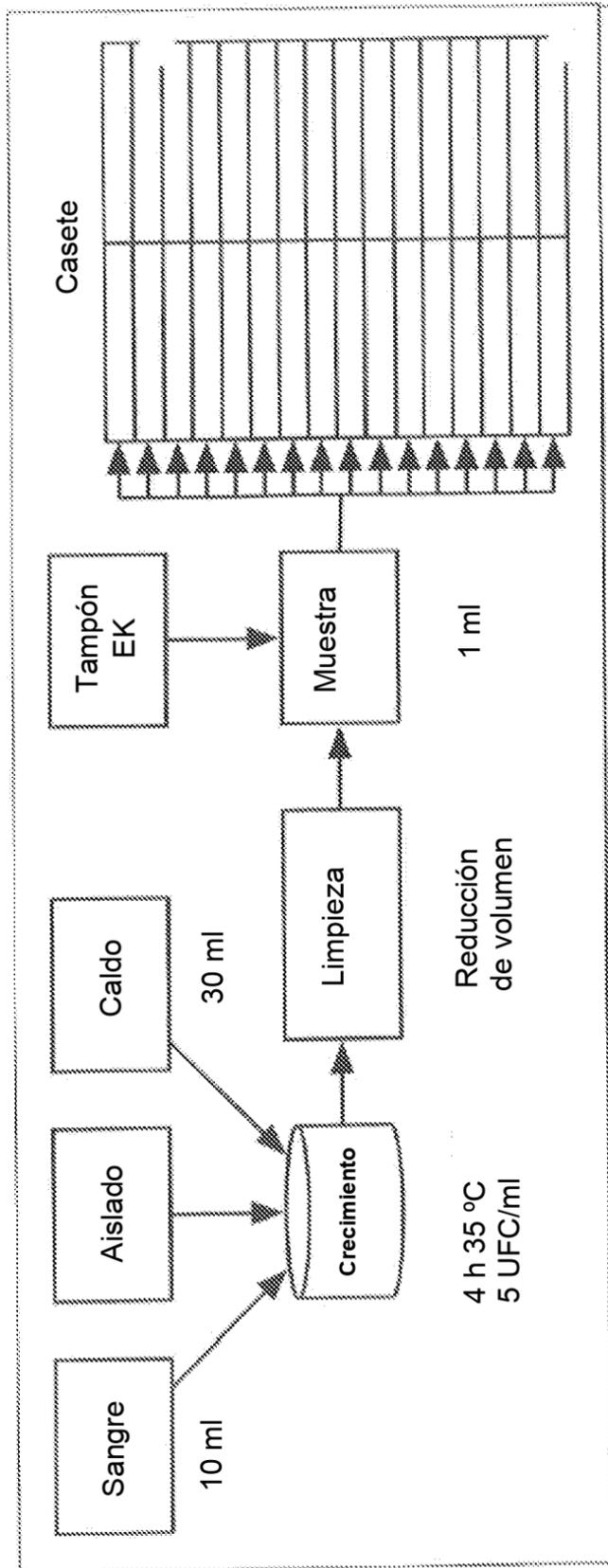


FIG. 2

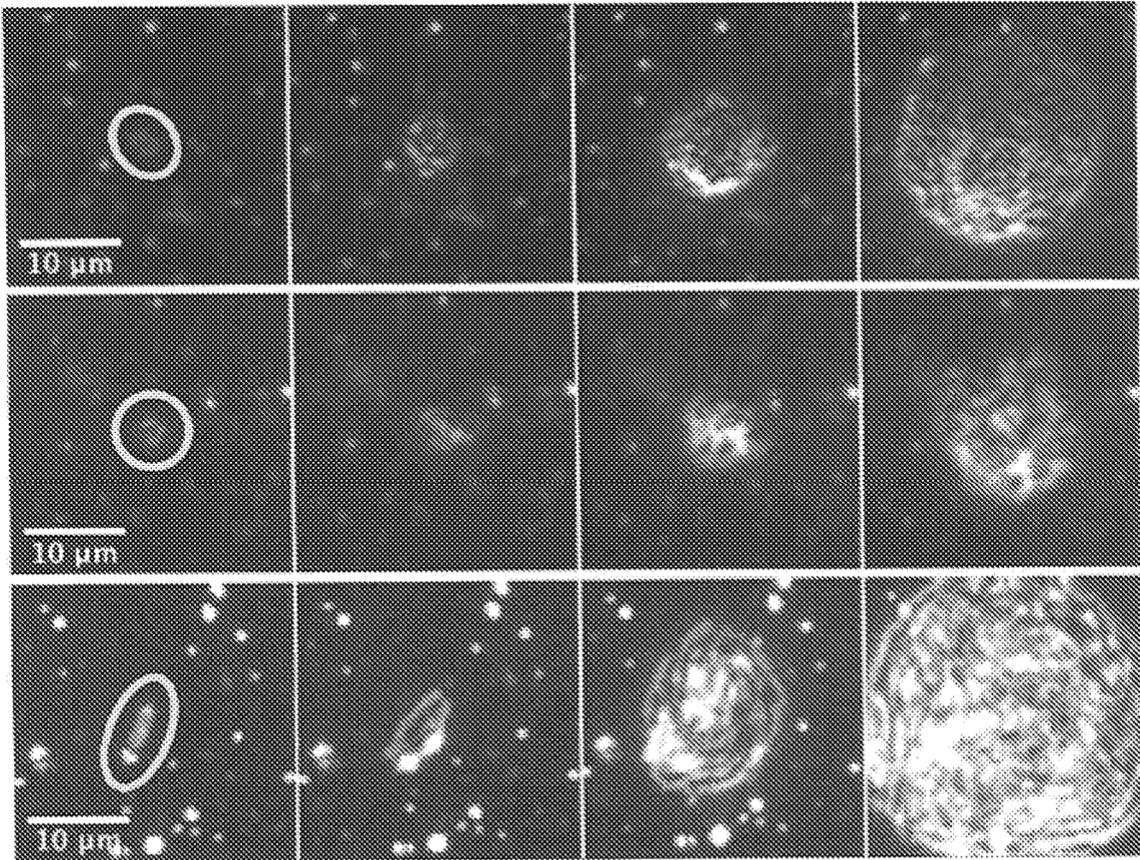


FIG. 3

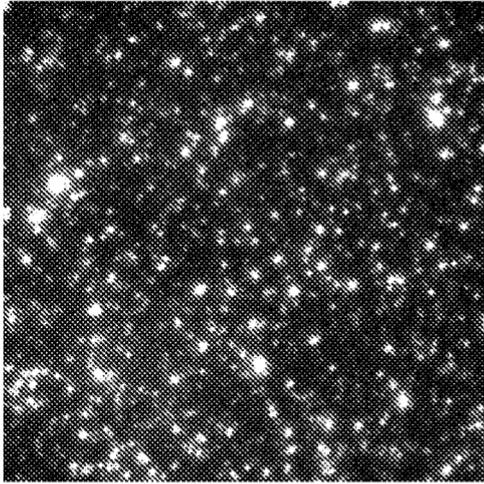


FIG. 4A-1

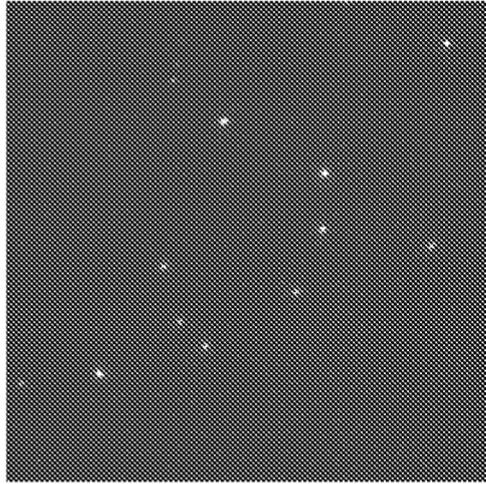


FIG. 4A-2



FIG. 4B-1

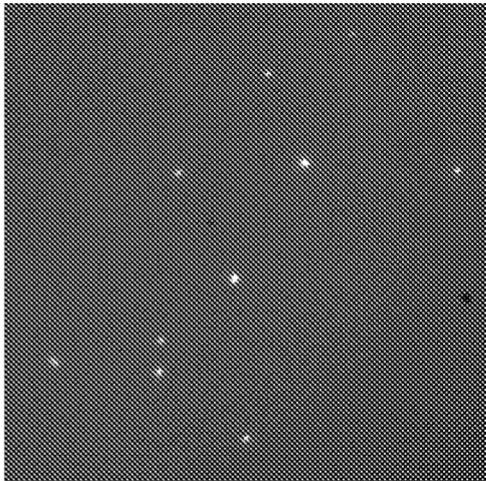


FIG. 4B-2

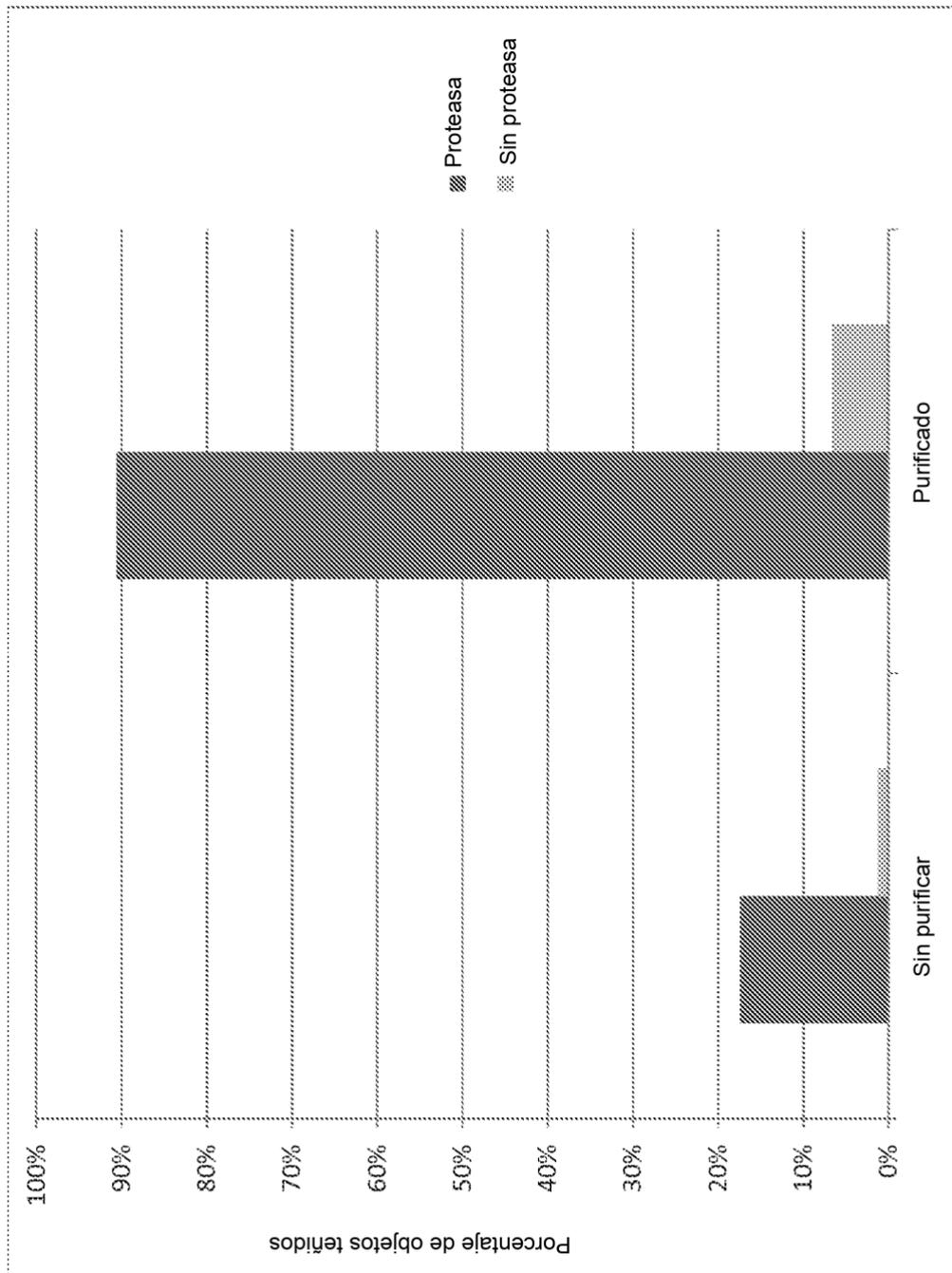


FIG. 5

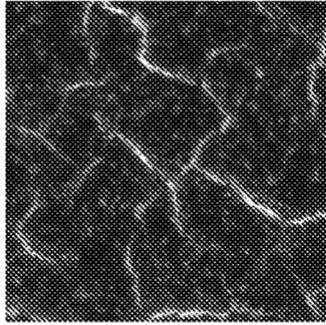


FIG. 6A-1



FIG. 6A-2

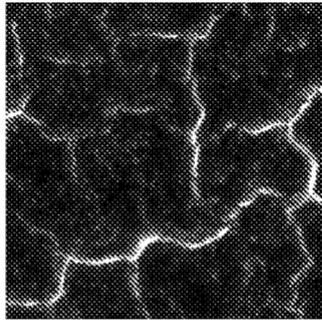


FIG. 6A-3

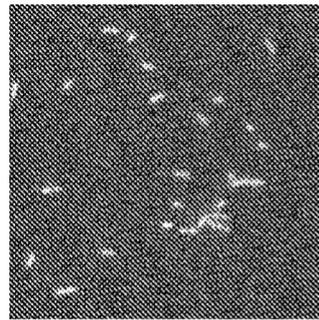


FIG. 6A-4

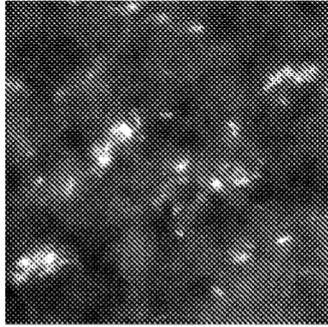


FIG. 6B-1

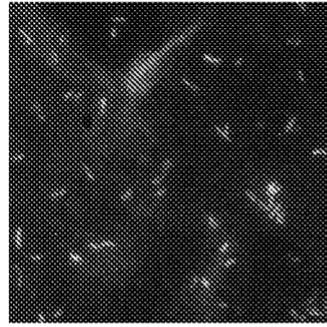


FIG. 6B-2

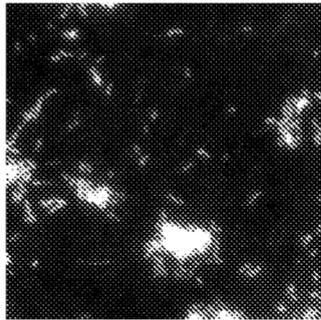


FIG. 6B-3

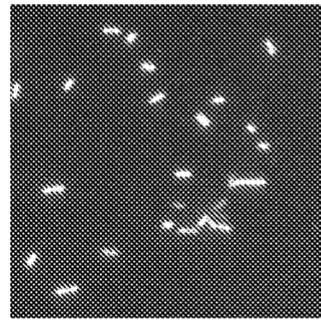


FIG. 6B-4

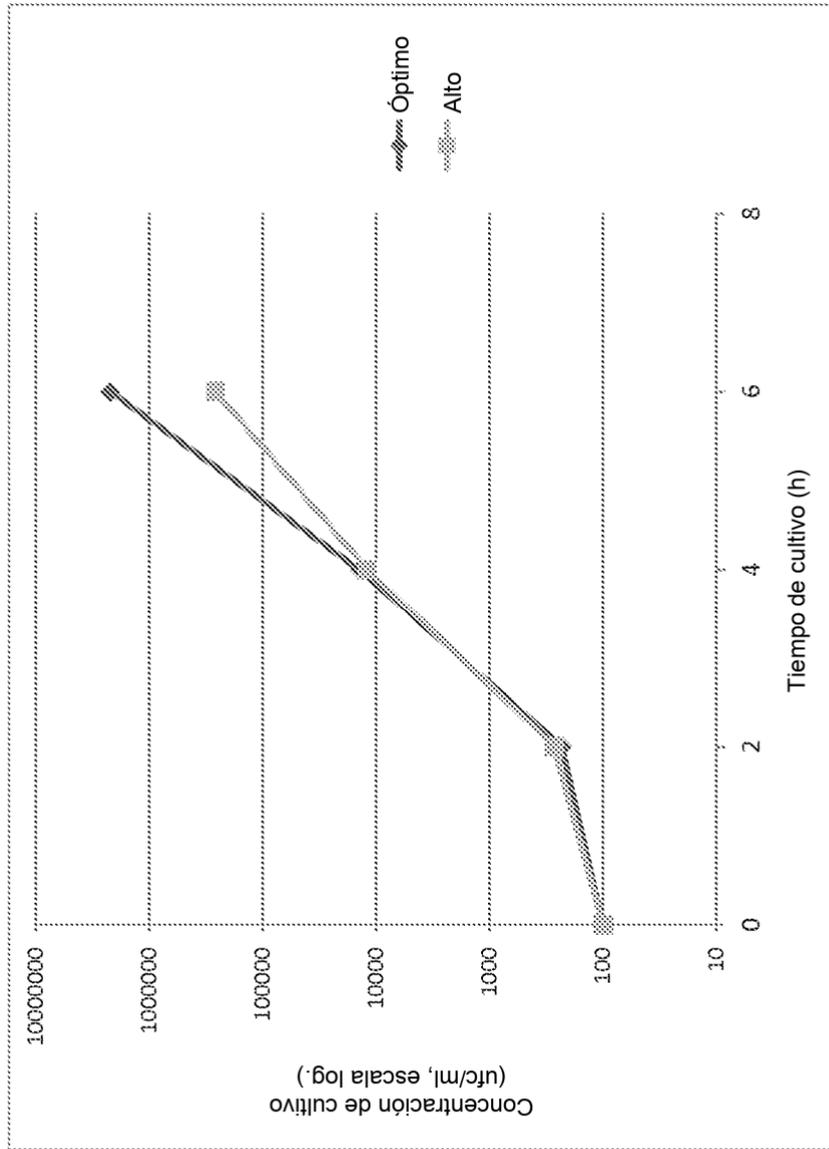


FIG. 7

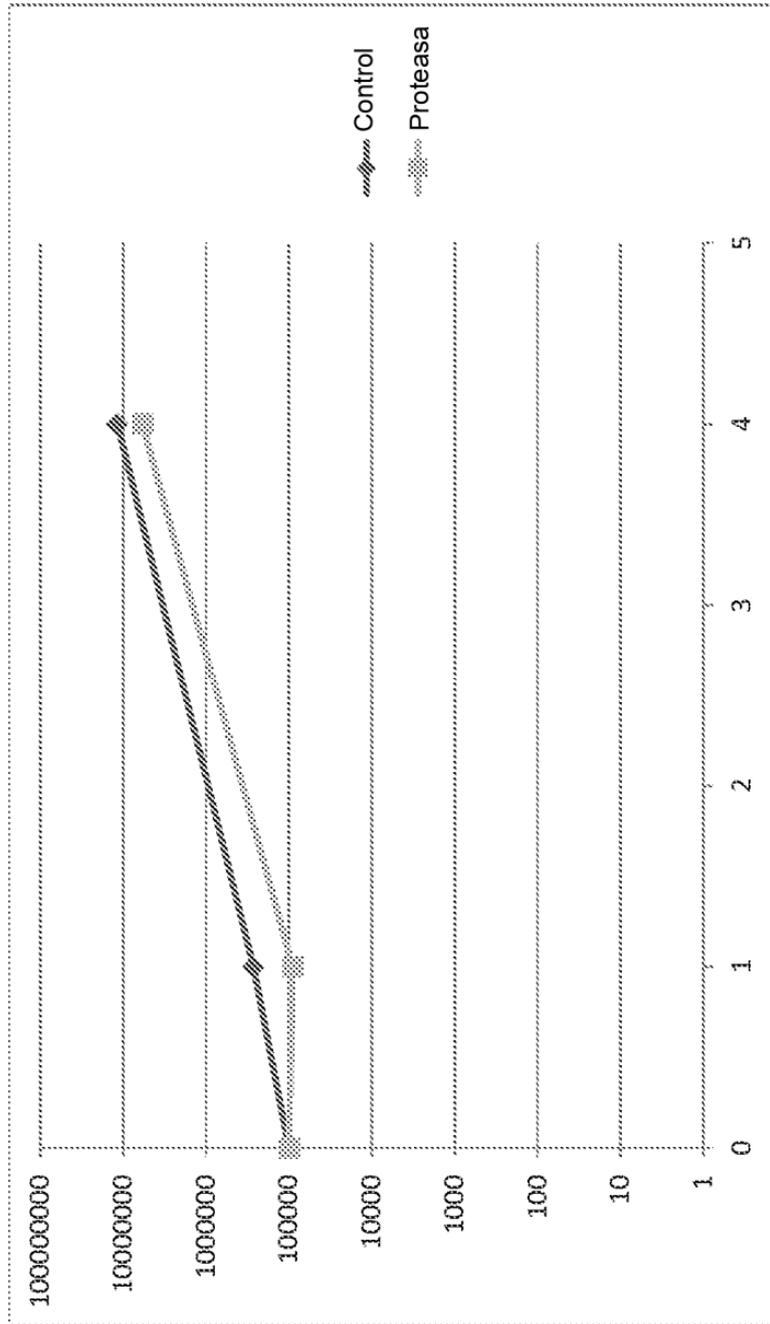


FIG. 8A

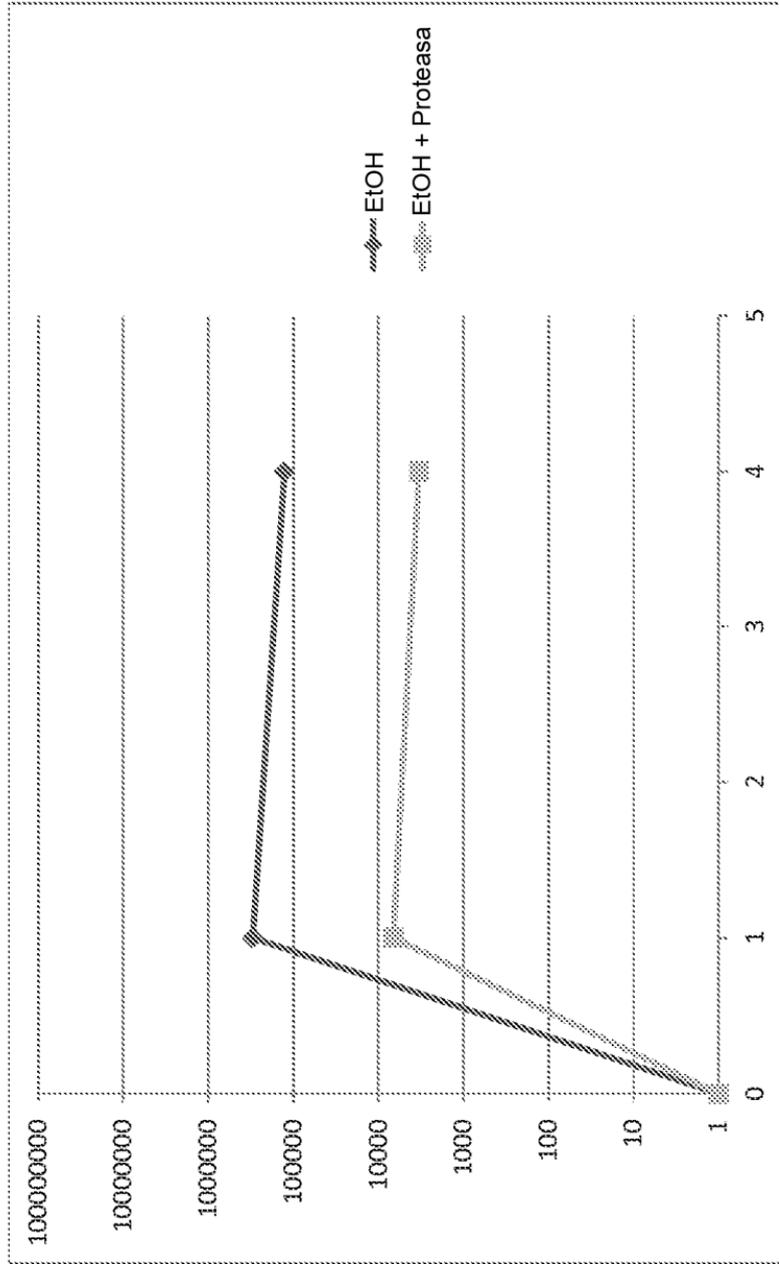


FIG. 8B

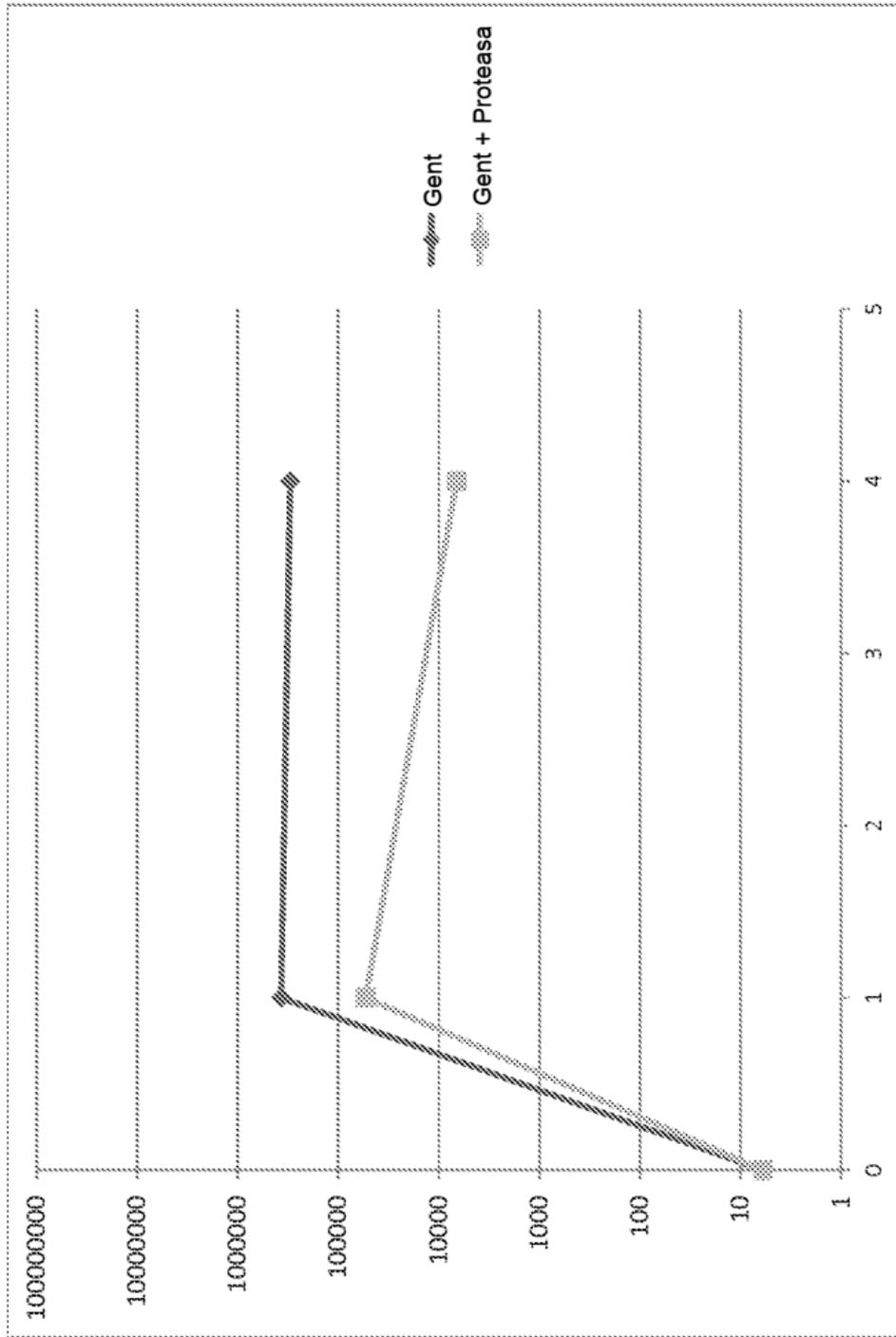


FIG. 8C