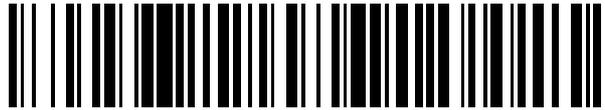


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 351**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/06** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12Q 1/24** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 1/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/CA2012/050922**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13091102**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12860922 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2794929**

54 Título: **Enriquecimiento y aislamiento de células microbianas y ácidos nucleicos microbianos a partir de una muestra biológica**

30 Prioridad:

**21.12.2011 US 201161578352 P**

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

**19.03.2020**

73 Titular/es:

**GENEOHM SCIENCES CANADA INC. (100.0%)  
2555, boulevard du Parc Technologique  
Québec, QC G1P 4S5, CA**

72 Inventor/es:

**MÉNARD, CHRISTIAN;  
ROY, ANNIE;  
BOUCHER, PATRICK y  
LÉTOURNEAU, STEVE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 749 351 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

Enriquecimiento y aislamiento de células microbianas y ácidos nucleicos microbianos a partir de una muestra biológica

5

### **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para preparar muestras biológicas para su análisis. Más particularmente, la presente invención se refiere al procesamiento de muestras biológicas para el enriquecimiento y aislamiento de células microbianas y sus ácidos nucleicos para su posterior análisis, incluyendo, por ejemplo, la amplificación de ácido nucleico. La presente invención también se refiere a la detección de células microbianas en muestras biológicas.

10

### **Referencia a la lista de secuencias**

15

Esta solicitud contiene una lista de secuencias en formato legible por ordenador titulada 787-Sequence listing\_ST25, creada el 17 de diciembre de 2012 que tiene un tamaño de 1 Kbytes, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

20

### **Antecedentes de la invención**

El aislamiento y la purificación de microorganismos y sus ácidos nucleicos a partir de materiales biológicos representan una técnica fundamental para el análisis y diagnóstico por biología molecular en medicina humana o veterinaria. Se necesita detectar infecciones de manera rápida y fiable para garantizar que se emprende sin retraso una terapia apropiada.

25

Muchos materiales y muestras biológicas de interés contienen sustancias que reducen la eficacia de pruebas de ácido nucleico. Por ejemplo, se conoce bien que muchas sustancias que inhiben la actividad enzimática están presentes en muchos tipos de células y pueden limitar el uso de ensayos de amplificación tales como PCR. Por ejemplo, el grupo hemo, el portador de oxígeno en la sangre, así como sus derivados, pueden inhibir la amplificación mediante PCR de ADN diana en muestras que contienen sangre. Los productos de descomposición de grupo hemo, tales como bilirrubina, así como sales biliares, pueden inhibir la PCR en muestras que contienen heces. Además, muchos de los reactivos usados para cultivar microorganismos o para preparar muestras para PCR pueden inhibir la amplificación cuando están presentes a niveles contaminantes incluyendo Triton, dodecilsulfato de sodio (SDS) y otros.

30

35

Además, las células huésped (es decir, células presentes de manera natural en la muestra que está sometándose a prueba para determinar la presencia de células microbianas contaminantes, por ejemplo, los glóbulos rojos y glóbulos blancos de un paciente) en muestras biológicas sometidas a prueba para determinar la presencia de células microbianas contribuyen a la "dilución" de ácidos nucleicos de células microbianas y conducen a una disminución de la sensibilidad del ensayo de diagnóstico. Por tanto, resultaría ventajoso separar y retirar tantas células del huésped como sea posible en la muestra biológica al tiempo que se mantiene la integridad de las células microbianas para aumentar la sensibilidad de pruebas de ácido nucleico.

40

45

Se han realizado intentos por retirar inhibidores de la amplificación (por ejemplo, células huésped, etc.) introducidos mediante métodos de procesamiento de sangre completa convencionales o bien 1) aislando los ácidos nucleicos a partir de la muestra prior para el análisis de ácido nucleico; o bien 2) diluyendo la muestra procesada para reducir el efecto de los inhibidores. Algunos protocolos convencionales para el análisis de ácido nucleico de sangre completa se basan en volúmenes iniciales de muestra de tan sólo 2-100  $\mu$ l para reducir inhibidores hasta un nivel aceptable. El aislamiento de ácidos nucleicos es molesto y requiere que esté presente una alta concentración de ácido nucleico para ser eficaz. La dilución o el uso de volúmenes de muestra pequeños compromete significativamente la sensibilidad del análisis de ácido nucleico.

50

55

Por ejemplo, el documento WO 2009/015484 describe un método para aislar microorganismos y/o ácidos nucleicos de los microorganismos a partir de líquidos corporales que comprende tratar la muestra con una dilución de saponina filtrada y tratada en autoclave a una concentración entre 20 y 100 mg/ml. El método implica la separación de células huésped a partir de células microbianas antes de la extracción de ácido nucleico.

60

65

El documento EP 0 745 849 describe un método que elimina inhibidores que interfieren en particular con reacciones enzimáticas de ácido nucleico y que también es compatible con técnicas de cultivo convencionales. Se logra la lisis selectiva de glóbulos rojos con Triton o saponina a una concentración final de entre el 0,1 y el 0,2%, seguida por centrifugación a 5.000-15.000xg durante 5-30 min y lavados posteriores para retirar inhibidores presentes en sangre completa o introducidos mediante reactivos usados en el protocolo de procesamiento de muestras. El volumen de muestra que puede procesarse usando este método es de hasta 5 ml. Aunque este método constituye una mejora con respecto a los métodos anteriores, todavía requiere una dilución de múltiples veces del volumen inicial de muestra, así como centrifugación a alta velocidad. Por tanto, se requiere el uso de etapas de procesamiento de

concentración para obtener ácidos nucleicos suficientemente concentrados para su análisis adicional. Además, la saponina es una sustancia químicamente compleja compuesta por diversos compuestos químicos y los solicitantes han observado que es propensa a variabilidad entre lotes lo cual reduce la reproducibilidad. Además, a las concentraciones empleadas, las saponinas no producen la lisis de glóbulos blancos tales como macrófagos, contribuyendo por tanto a la “dilución” de células microbianas lo cual con frecuencia da como resultado una disminución de la sensibilidad.

El documento EP 2 325 312 A1 da a conocer un método para el procesamiento de una muestra biológica para el análisis de ácido nucleico de microorganismos, de manera notable de una muestra de sangre que contiene microorganismos tales como hongos y bacterias, usando lisis selectiva de células sanguíneas humanas, usando un tampón de lisis celular que contiene un detergente tal como SDS

RESTREPO B *et al.* JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, vol. 67, n.º 2, 5 de mayo de 2006, páginas 220-229 da a conocer un método de procesamiento de una muestra biológica para el análisis de ácido nucleico de microorganismos, de manera notable de sangre que contiene micobacterias, usando lisis selectiva de glóbulos (blancos) usando un protocolo de lisis de WCL-OBL usando un tampón de lisis que contiene EDTA 0,02 M, el 0,22% de SDS.

Algunos productos comercialmente disponibles para purificar ácidos nucleicos a partir de líquidos corporales implican la lisis simultánea de glóbulos rojos y blancos, así como células microbianas (kit de preparación SeptiFast™ de Roche Diagnostics; kit de extracción de ácido nucleico IsoQuick™ de ISC BioExpress; y sistema Nuclisens™ easyMAG™ de Biomerieux). Una desventaja de este enfoque es la presencia de una mayor proporción de ácidos nucleicos de células sanguíneas que de ácidos nucleicos microbianos lo cual reduce la sensibilidad de la detección microbiana en la muestra. Además, sistemas tales como el kit de preparación SeptiFast™ requieren numerosas etapas de manipulación y requieren aproximadamente dos horas de tratamiento antes de la extracción de ADN humano y microbiano. Además, se mostró que la mayoría de las muestras de sangre extraídas de pacientes con septicemia pueden contener tan sólo 10 unidades formadoras de colonias (UFC) de células microbianas/ml de sangre (Johnson *et al.*, 1993, APMIS, 101:595-601), lo cual puede ser insuficiente para permitir la detección usando estos métodos de procesamiento. Por ejemplo, la sensibilidad analítica del kit de preparación SeptiFast™ es de aproximadamente 30 UFC de microbios/ml de sangre lo cual es muy superior a la concentración de microbios observada en algunos pacientes con septicemia.

Por consiguiente, el método de procesamiento de muestras ideal para la purificación y el aislamiento de células microbianas a partir de muestras biológicas y posterior liberación de ácidos nucleicos para pruebas de ácido nucleico incluirá las siguientes características: 1) retira inhibidores de la amplificación y detección, en particular aquellos introducidos mediante lisis de las células del huésped (por ejemplo, glóbulos rojos); 2) libera una cantidad suficiente de ácidos nucleicos a partir de los microorganismos para su amplificación; 3) permite el procesamiento de grandes volúmenes de muestra para mejorar la sensibilidad de detección; 4) usa un único protocolo, que permite la recuperación de células microbianas viables e intactas que posteriormente pueden cultivarse para pruebas bioquímicas; y 5) es sencillo, rápido y requiere un número limitado de etapas de procesamiento para reducir la posible contaminación cruzada y el tiempo antes de que esté disponible un diagnóstico.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método que permite ventajosamente el procesamiento de grandes volúmenes de muestras biológicas tales como sangre completa. A diferencia de métodos anteriores, en los que el volumen de muestra que podía analizarse estaba con frecuencia limitado por la presencia de inhibidores (especialmente en el caso de la sangre), mediante el método de la presente invención pueden procesarse volúmenes significativamente mayores y amplificarse ácidos nucleicos a partir de microorganismos de manera reproducible. La capacidad de amplificar a partir de grandes volúmenes de muestra usando menos etapas de procesamiento permite al técnico detectar más rápidamente secuencias diana poco frecuentes que pueden no detectarse cuando tiene que amplificarse una pequeña alícuota de una muestra o una muestra diluida para evitar la interferencia de inhibidores.

La invención se refiere a un método para procesar una muestra biológica que contiene células de un sujeto para el análisis de ácido nucleico de células microbianas en la muestra biológica que comprende, o que consiste esencialmente en:

i) poner la muestra biológica obtenida de un sujeto directamente en contacto con un pequeño volumen menor de 1 ml de una disolución de lisis celular diferencial que consiste esencialmente en SDS en agua o solución salina para obtener una concentración final del 0,1 al 1% de SDS en dicha muestra y opcionalmente un agente antiespumante y/o un anticoagulante, en el que el volumen inicial de muestra biológica es mayor de 3 ml;

ii) mezclar la disolución obtenida en la etapa i) durante un periodo de tiempo suficiente para someter a lisis las células objeto presentes en la muestra biológica, al tiempo que se conserva la integridad de las células microbianas; y

iii) separar las células microbianas de los componentes de células objeto sometidas a lisis, en el que la etapa iii) consiste en una única centrifugación, seguida por retirada del sobrenadante y resuspensión de las células microbianas, en el que las células objeto son glóbulos rojos y glóbulos blancos en la sangre; células de vejiga, células de riñón y células de próstata en la orina, o células epiteliales en la saliva.

5 Este método es compatible tanto con técnicas de cultivo convencionales como con análisis de ácido nucleico permitiendo procesar una única muestra biológica para ambos usos sin necesidad de protocolos de procesamiento de muestras independientes. El método se basa en el descubrimiento de reactivos y procedimientos que pueden usarse para someter selectivamente a lisis las células del huésped (del sujeto) (por ejemplo, glóbulos rojos y  
10 glóbulos blancos) sin lisis sustancial de las células de los microorganismos que van a detectarse en la muestra biológica. Los ácidos nucleicos de microorganismos se protegen dentro de la célula y pueden separarse de las células huésped sometidas a lisis (por ejemplo, presentes en el sobrenadante tras la centrifugación) para un procesamiento de muestra adicional. Después se liberan los ácidos nucleicos para su posterior análisis.

15 El método puede emplear ventajosamente una única etapa de centrifugación (por ejemplo, entre aproximadamente 3200g y aproximadamente 10000g) para concentrar microorganismos, en contraposición a múltiples centrifugaciones/lavados. Además, el método de la presente invención puede comprender la adición de un pequeño volumen de disolución de lisis diferencial al volumen inicial de muestra biológica evitando así la dilución de múltiples  
20 veces de la muestra y la necesidad de etapas de concentración adicionales o el uso de volúmenes de muestra más pequeños. Ventajosamente, no se requiere ningún equipo especializado para poner en práctica la presente invención. Los reactivos son económicos y están fácilmente disponibles, y ninguno requiere una manipulación especial.

Más específicamente, según la presente divulgación se proporciona un método para procesar una muestra biológica para el análisis de ácido nucleico de microorganismos que comprende:

i) añadir a un volumen inicial de dicha muestra biológica una disolución de lisis celular diferencial para obtener una concentración final del 0,1 al 1% de SDS en dicha muestra;

30 ii) mezclar la disolución obtenida en la etapa i) durante un periodo de tiempo suficiente para someter a lisis las células huésped presentes en la muestra biológica, al tiempo que se conserva la integridad de las células microbianas; y

35 iii) separar las células microbianas de los componentes de células huésped sometidas a lisis.

En una realización, la etapa iii) consiste en una única centrifugación, seguida por retirada del sobrenadante y resuspensión de las células microbianas.

40 En una realización, la resuspensión de las células microbianas se realiza en aproximadamente de 1/10 a 1/100 del volumen inicial de muestra biológica.

En una realización, las células microbianas se resuspenden en una disolución que consiste esencialmente en agua, solución salina, medio de cultivo o un tampón compatible con la extracción y análisis de ácido nucleico.

45 En una realización, la centrifugación anteriormente descrita se realiza a entre aproximadamente 3200g y 10000g. En una realización particular la centrifugación se realiza a aproximadamente 10000g. En otra realización la centrifugación se realiza a aproximadamente 3200g durante de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 minutos.

50 En una realización, el mezclado en la etapa ii) del método anteriormente descrito consiste en mezclar la disolución a entre aproximadamente 150 y aproximadamente 200 rpm. En una realización, el mezclado se realiza durante al menos aproximadamente 3 minutos. En una realización preferida, el mezclado se realiza durante al menos aproximadamente 5 minutos. En otra realización preferida, el mezclado se realiza a aproximadamente 170 rpm durante aproximadamente 5 minutos.

55 En una realización, el método anteriormente descrito comprende además añadir perlas de vidrio. Las perlas de vidrio pueden añadirse en cualquier etapa entre la etapa i) y la etapa iii). Las perlas de vidrio también pueden añadirse a las células microbianas una vez que se han separado las células huésped de las células microbianas (es decir, al final de la etapa iii)). Preferiblemente, las perlas de vidrio se añaden en la etapa i). Preferiblemente, las perlas de vidrio consisten en una combinación de perlas de vidrio grandes que oscilan entre aproximadamente 710 y  
60 aproximadamente 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro y en perlas de vidrio pequeñas que oscilan entre aproximadamente 150 y aproximadamente 212  $\mu\text{m}$  de diámetro. En una realización, la cantidad de perlas de vidrio consiste en 3-5 veces la combinación convencional de perlas de vidrio pequeñas y grandes (la combinación convencional es de 40 mg +/- 20% de perlas que oscilan entre 150 y 212  $\mu\text{m}$  y 15 mg +/- 35% de perlas que oscilan entre 710 y 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro, véase Ruclanap™, patente estadounidense n.º 7.494.771).

65 En una realización, el método de la presente invención comprende además la etapa iv) que consiste en someter a

lisis células microbianas para liberar sus ácidos nucleicos en disolución. En una realización, la etapa iv) implica la lisis mecánica de células microbianas. En una realización, se realiza lisis mecánica mediante agitación con vórtex de las células microbianas.

5 En una realización, el método de la presente invención comprende además calentar las células microbianas tras su lisis. En una realización, el calentamiento se realiza a aproximadamente 95°C durante al menos aproximadamente 5 minutos.

10 En una realización, el método de la presente invención comprende además la etapa v) que comprende purificar ácidos nucleicos liberados a partir de las células microbianas. En una realización, los ácidos nucleicos se purifican usando perlas magnéticas.

15 En otra realización, la etapa iv) implica la digestión enzimática de células microbianas. En una realización, la lisis se realiza usando acromopeptidasa.

En una realización del método de la presente invención, la muestra biológica es una muestra de sangre. En una realización particular, la muestra biológica es una muestra de sangre completa. En una realización particular, la muestra de sangre comprende un anticoagulante.

20 En un aspecto relacionado, el método de la presente invención puede comprender además en la etapa i) añadir un anticoagulante. En una realización particular, el anticoagulante es EDTA.

25 En otra realización del método de la presente invención, la etapa i) comprende además añadir un agente antiespumante. En una realización, el agente antiespumante es silicona.

En una realización, el volumen inicial de muestra biológica usado según el método de la presente invención es de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 ml. En una realización, el volumen inicial de muestra biológica es mayor de 3 ml.

30 En una realización, el método de la presente invención comprende además cultivar una fracción de las células microbianas.

35 En otra realización, el método de la presente invención comprende además amplificar una secuencia de ácido nucleico diana presente en las células microbianas.

En una realización particular la disolución de lisis celular diferencial consiste esencialmente en SDS en agua o solución salina. En una realización adicional, la disolución de lisis celular diferencial comprende del 1 al 20% de SDS, preferiblemente el 10% de SDS.

40 En una realización específica, el método de la presente invención consiste esencialmente en las etapas descritas anteriormente (es decir, no incluye etapas adicionales no dadas a conocer que modifiquen significativamente el método de la presente invención).

45 En una realización preferida, la concentración final de SDS una vez que se ha añadido la disolución de lisis diferencial es de entre aproximadamente el 0,4% y aproximadamente el 0,75% (por ejemplo, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75). En una realización particular, la concentración final de SDS es de entre aproximadamente el 0,4% y aproximadamente el 0,5%. En una realización particularmente preferida, la concentración final de SDS es de aproximadamente el 0,5% de SDS. En aún otro aspecto, la concentración final de SDS una vez que se ha añadido la disolución de lisis celular diferencial es de entre aproximadamente el 0,1% y el 1% de SDS.

50 En una realización el método anteriormente descrito comprende además el uso de un sistema automatizado tal como el sistema BD MAX™ para iv) someter a lisis células microbianas; v) aislar y purificar ácidos nucleicos microbianos; vi) realizar la amplificación y detección de ácidos nucleicos microbianos; o vii) cualquier combinación de iv) a vi).

55 En un aspecto relacionado, la presente divulgación se refiere a un kit para poner en práctica el método anteriormente descrito de la presente invención.

60 La invención también se refiere al uso de un kit para poner en práctica el método tal como se definió anteriormente que comprende: i) una disolución de lisis celular diferencial que consiste esencialmente en del 1 al 20% de SDS como agente de lisis y al menos uno de: ii) uno o más reactivos para la extracción de ácido nucleico microbiano; iii) uno o más reactivos para la purificación de ácido nucleico microbiano; iv) uno o más reactivos para la detección de células microbianas o ácido nucleico microbiano; v) un anticoagulante; vi) un agente antiespumante; y vii) instrucciones para poner en práctica el método.

65 En una realización, el kit comprende i) una disolución de lisis celular diferencial que comprende SDS como agente

de lisis y al menos uno de: ii) uno o más reactivos para la extracción de ácido nucleico microbiano; iii) uno o más reactivos para la purificación de ácido nucleico microbiano; iv) uno o más reactivos para la detección de células microbianas o ácido nucleico microbiano; v) un anticoagulante; vi) un agente antiespumante; y vii) instrucciones para poner en práctica el método de la presente invención. En una realización, el kit comprende al menos dos de ii) a vii).  
 5 En una realización, el kit comprende al menos tres de ii) a vii). En una realización, el kit comprende al menos cuatro de ii) a vii). En una realización, el kit comprende al menos cinco de ii) a vii).

En una realización el kit comprende además un tubo de recogida de muestra biológica. En una realización, el kit comprende una combinación de perlas de vidrio para la extracción de ácido nucleico microbiano. En una realización,  
 10 la combinación de perlas de vidrio consiste en una combinación de perlas de vidrio grandes que oscilan entre aproximadamente 710 y aproximadamente 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro y de perlas de vidrio pequeñas que oscilan entre aproximadamente 150 y aproximadamente 212  $\mu\text{m}$  de diámetro. En una realización adicional, la combinación de perlas de vidrio consiste en 3-5 veces la combinación convencional de perlas de vidrio pequeñas y grandes (la combinación convencional es de 40 mg +/- 20% de perlas que oscilan entre 150 y 212  $\mu\text{m}$  y 15 mg +/- 35% de perlas  
 15 que oscilan entre 710 y 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro, véase Ruclanap, patente estadounidense n.º 7.494.771).

En una realización, el uno o más reactivos para la extracción de ácido nucleico microbiano comprenden acromopeptidasa. En una realización, el uno o más reactivos para la purificación de ácido nucleico microbiano comprenden perlas magnéticas. En una realización, el kit comprende EDTA como anticoagulante.

En una realización, el kit comprende uno o más oligonucleótidos para detectar la presencia de uno o más ácidos nucleicos microbianos. En una realización, el kit comprende además reactivos para la amplificación de ácido nucleico. En una realización, el kit comprende uno o más reactivos para cultivo de células microbianas.

En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona una disolución de lisis celular diferencial que consiste esencialmente en agua y aproximadamente del 1% al 20% de SDS, preferiblemente, el 10% de SDS.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención resultarán más evidentes tras leer la siguiente descripción no limitativa de realizaciones específicas de la misma, facilitada únicamente a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos.

### Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos:

la figura 1 es una representación esquemática de una realización del método de preparación de muestras para muestras de sangre de 10 ml;

la figura 2 muestra resultados de PCR en tiempo real a partir del procesamiento de muestras de 5 y 10 ml de donaciones de sangre con adiciones conocidas de *S. aureus* a cargas de UFC variables. Los volúmenes de reactivos de PCR añadidos para la amplificación mediante PCR fueron de 4,7  $\mu\text{l}$ , 9,4  $\mu\text{l}$  (excepto por E34) y 18,8  $\mu\text{l}$ , en un volumen de PCR final de 25  $\mu\text{l}$ . Las UFC relativas/PCR se indican considerando un rendimiento del 100% del procedimiento entero. Las barras rojas horizontales indican valores de referencia para las mismas cargas de ADN estimadas a partir de una curva patrón de PCR realizada con ADN puro. El panel A muestra el umbral de ciclo (CT); el panel B el punto final (EP) y el panel C el pico de fusión para diversos experimentos; y

la figura 3 muestra resultados de PCR en tiempo real a partir del procesamiento de muestras de 10 ml de sangre fresca con adiciones conocidas de *S. aureus* a 200 y 40 UFC/10 ml y de UFC cargadas directamente en un tubo de lisis de IDI (ahora comercializado con el nombre de kit de lisis BD GeneOhm™, n.º de cat. 441243) (PCL). Los volúmenes de reactivos de PCR añadidos para la amplificación mediante PCR fueron de 4,7  $\mu\text{l}$ , 9,4  $\mu\text{l}$  y 18,8  $\mu\text{l}$ , en un volumen de PCR final de 25  $\mu\text{l}$ . Las UFC relativas/PCR se facilitan entre paréntesis teniendo en cuenta un rendimiento del 100% del procedimiento entero. Las barras rojas horizontales indican valores de referencia para las mismas cargas de ADN estimadas a partir de una curva patrón de PCR realizada con ADN puro. Se indica la razón de n.º detectado/n.º sometido a prueba. El panel A muestra el CT; el panel B el EP y el panel C el pico de fusión para diversos experimentos

### Descripción de realizaciones ilustrativas

Con el fin de proporcionar una comprensión clara y sistemática de los términos usados en la presente divulgación, a continuación, se proporcionan varias definiciones. Además, a menos que se recomiende lo contrario, todos los términos técnicos y científicos tal como se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto habitual en la técnica a la que se refiere la presente invención.

En la totalidad de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o método que está empleándose para determinar el valor. Esto puede incluir

generalmente variaciones de entre el 1-10%.

El uso del término “un” “una” y “el/la” cuando se usan junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno” pero también es compatible con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.

Tal como se usan en esta memoria descriptiva y la(s) reivindicación/reivindicaciones, los términos “que comprende” (y cualquier forma de “que comprende”, tal como “comprender” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de “que tiene”, tal como “tener” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de “que incluye”, tal como “incluye” e “incluir”) o “que contiene” (y cualquier forma de “que contiene”, tal como “contiene” y “contener”) son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos o etapas de método adicionales, no mencionados, y se usan de manera intercambiable con las expresiones “que incluye, pero no se limita a” y “que comprende, pero no se limita a”.

Tal como se usa en el presente documento, la “concentración final” con respecto al SDS se refiere a la concentración de SDS una vez mezclado con una muestra, por ejemplo, una vez mezclado (puesto en contacto) con una muestra biológica. En el caso en el que se añaden reactivos adicionales a la muestra (por ejemplo, un agente antiespumante, un anticoagulante, perlas de vidrio etc.), la concentración final de SDS es con respecto al volumen final de la muestra durante la lisis diferencial (es decir, teniendo en cuenta el volumen final de la muestra, una vez que se han añadido estos reactivos adicionales). Evidentemente, puede añadirse SDS antes o después de estos agentes adicionales, pero la concentración final debe ser con respecto al volumen final de muestra durante la lisis celular. Debe entenderse que cualquier intervalo o grupo especificado es una forma abreviada de referirse a todos y cada uno de los miembros de un intervalo o grupo de manera individual, así como a todos y cada uno de los posibles subintervalos o subgrupos abarcados en el mismo y de manera similar con respecto a cualquier subintervalo o subgrupo en el mismo. La presente invención se refiere e incorpora específicamente todos y cada uno de los elementos específicos y combinaciones de subintervalos o subgrupos en la misma. Por tanto, por ejemplo, cuando se dice que una concentración final de SDS es de entre el 0,1 y el 1%, la concentración final de SDS puede ser del 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19 o 0,2, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,5, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 y 1% por ejemplo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra biológica” incluye, pero no se limita a, sangre (sangre completa y fracciones de la misma (por ejemplo, plaquetas de sangre en plasma, plasma, suero), líquido amniótico, humor acuoso, bilis, lavados de vejiga, exudado de mama, lavados bronquioalveolares, líquido cefalorraquídeo, quilo, quimo, heces, líquido intersticial, linfa, menstruación, mucosa, líquido pleural, pus, saliva, sebo, semen, esputo, sudor, líquido sinovial, lágrimas, orina y/o humor vítreo. En una realización preferida de la presente invención, la muestra biológica es sangre. En una realización, la muestra biológica se obtiene a partir de un mamífero tal como un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento se pretende que la expresión “sangre completa” se refiera a sangre con todos sus componentes intactos (es decir, el plasma y las plaquetas no se han retirado) que se ha extraído de un sujeto. Ventajosamente la muestra de “sangre completa” puede incluir ya un anticoagulante tal como EDTA para evitar la formación de coágulos de sangre.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” o “huésped” se refiere a cualquier animal de interés en el que se desea determinar la presencia o ausencia de uno o más microorganismos. Los ejemplos no limitativos incluyen ratones, ratas, cerdos, vacas, mascotas (por ejemplo, gatos, perros, etc.), conejos, caballos, cabras, etc. Preferiblemente, el animal es un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

Según la presente invención “inhibidor de la amplificación” e “inhibidor de la detección” incluyen cualquier sustancia que impide o previene la amplificación o detección de una secuencia de ácido nucleico diana. En un aspecto, los microorganismos y/o ácidos nucleicos de microorganismos aislados según el método de la presente invención están sustancialmente libres de inhibidores de la amplificación y/o detección. Los ejemplos no limitativos de inhibidores de la amplificación y detección incluyen proteínas (por ejemplo, inmunoglobulinas), lípidos, polisacáridos, grupo hemo y derivados de grupo hemo (por ejemplo, hemina, hematina, hematóporfirina, derivados de porfirina), sales biliares y otras sustancias derivadas de células (por ejemplo, hormonas, quercetina, etc.), compuestos orgánicos e inorgánicos usados para la preparación de ácido nucleico.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “secuencia diana” o “secuencia de ácido nucleico diana” designa un ácido nucleico de interés que se usa generalmente para determinar la presencia o ausencia de microorganismo(s) dado(s) en una muestra. Una “secuencia diana específica” permitirá la detección de una especie, género, familia o grupo de microorganismos particulares al tiempo que se evita la detección no deseada de células microbianas relacionadas. Preferiblemente, los microorganismos son bacterias.

Tal como se usa en el presente documento, el término “lisis” en relación con células significa generalmente cualquier procedimiento que conduce a la alteración de la estructura exterior de las células y sus orgánulos. La lisis celular conduce a la descomposición de la célula intacta y la liberación del ácido nucleico a partir de los orgánulos o compartimentos celulares respectivos (por ejemplo, núcleo celular y mitocondria). El ADN en células eucariotas está

separado del medio circundante al menos por la envuelta nuclear y la membrana citoplasmática. En bacterias, que no tienen un núcleo, los ácidos nucleicos están separados del medio circundante por una membrana citoplasmática y una pared celular de peptidoglicano y posiblemente una capa de lipopolisacárido. Tanto en células eucariotas como procariontes, la lisis celular conduce a muerte celular.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “lisis celular diferencial” se refiere a la lisis selectiva de células huésped (la totalidad o una fracción de las mismas) presentes en una muestra biológica al tiempo que se mantiene la integridad de células microbianas.

10 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “microorganismos”, “células microbianas” y “microbios” se usan de manera intercambiable en la totalidad de la memoria descriptiva e incluyen bacterias, levaduras, hongos o cualquier combinación de los mismos. Los microorganismos/células microbianas de la presente invención pueden ser aerobios o anaerobios. En una realización a modo de ejemplo, los microorganismos pueden provocar infecciones tales como infecciones del torrente sanguíneo. Los microorganismos de la presente invención también pueden ser  
15 microorganismos que provocan septicemia, es decir, microorganismos tales como bacterias, levaduras y/u hongos que conducen a un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Los microorganismos que pueden purificarse según la presente invención incluyen los enumerados en la base de datos de microbios de Rosetta stone, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/19>.

20 Los géneros de microorganismos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, género *Acinetobacter*, género *Bacteroides*, género *Burkholderia*, género *Capnocytophaga*, género *Clostridium*, género *Corynebacterium*, género *Citrobacter*, género *Enterobacter*, género *Enterococcus*, género *Escherichia*, género *Haemophilus*, género *Klebsiella*, género *Proteus*, género *Pseudomonas*, género *Serratia*, género *Staphylococcus*, género *Stenotrophomonas*, género *Streptococcus*, género *Aspergillus* y/o género *Candida*.

25 Los microorganismos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: *Abiotrophia adiacens*, *Abiotrophia defective*, *Achromobacter xylosoxidans* subesp. *denitrificans*, *Acetobacterium woodii*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter altoacetigenes*, *Acetobacter polyoxogenes*, *Acholeplasma laidlawii*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Acidiphilum facilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Actinomyces meyeri*, *Aerococcus viridans*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis* subesp. *faecalis*, *Allochrochromatium vinosum*, *Anabaena variabilis*, *Anacystis nidulans*, *Anaerorhabdus furcosus*, *Aquifex aeolicus*, *Aquifex pyrophilus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides forsythus*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, *Bartonella henselae*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium longum*, *Blastochloris viridis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella abortus*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium flavum*, *Brevundimonas diminuta*, *Buchnera aphidicola*, *Budvicia aquatica*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*,  
40 *Buttiauxella agrestis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter fetus* subesp. *fetus*, *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter jejuni* subesp. *doylei*, *Campylobacter jejuni* subesp. *jejuni*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter sputorum* subesp. *sputorum*, *Campylobacter upsaliensis*, *Cedecea davisae*, *Cedecea lapagei*, *Cedecea neteri*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlorobium vibrioforme*,  
45 *Chloroflexus aurantiacus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter farmeri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter werkmanii*, *Citrobacter youngae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium tertium*, *Clostridium tetani*,  
50 *Comamonas acidovorans*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium cervicis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium flavescens*, *Corynebacterium genitalium*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium kutscheri*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium mycetoides*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium pseudogenitalium*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Coxiella burnetii*, *Cytophaga lytica*, *Deinococcus radiodurans*, *Deinonema sp.*, *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella tarda*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia risticii*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus columbae*,  
60 *Enterococcus dispar*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus solitarius*, *Enterococcus sulfureus*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Eubacterium lentum*, *Eubacterium nodatum*, *Ewingella americana*, *Francisella tularensis*, *Frankia alni*, *Fervidobacterium islandicum*, *Fibrobacter succinogenes*, *Flavobacterium ferrugineum*, *Flexistipes sinuarabici*, *Fusobacterium gonidiaformans*, *Fusobacterium necrophorum* subesp. *necrophorum*, *Fusobacterium*

*nucleatum* subesp. *polymorphum*, *Gardnerella vaginalis*, *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum*, *Globicatella sanguis*, *Gloeobacter violaceus*, *Gloeotheca* sp., *Gluconobacter oxydans*, *Haemophilus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus paraphrophilus*, *Haemophilus segnis*, *Hafnia alvei*,  
5 *Halobacterium marismortui*, *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii*, *Helicobacter pylori*, *Herpetosiphon aurantiacus*, *Kingella kingae*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae* subesp. *ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae* subesp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subesp. *rhinoscleromatis*, *Klebsiella tenigena*, *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Kluyvera georgiana*, *Kocuria kristinae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus garvieae*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* subesp.  
10 *casei*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Leclercia adecarboxylata*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila* subesp. *pneumophila*, *Leminorella grimontii*, *Leminorella richardii*, *Leptospira biflexa*, *Leptospira interrogans*, *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *dextranicum*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Macrococcus caseolyticus*, *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Megamonas hypermegale*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus jannaschii*,  
15 *Methanococcus vannielii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina jannaschii*, *Methylobacillus flagellatum*, *Methylomonas clara*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lylae*, *Mitsuokella multacidus*, *Mobiluncus curtisii* subesp. *holmesii*, *Moellerella thermoacetica*, *Moellerella wisconsensis*, *Moorella thermoacetica*, *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella osloensis*, *Morganella morganii* subesp. *morganii*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*,  
20 *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma salivarium*, *Myxococcus xanthus*, *Neisseria animalis*, *Neisseria canis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria cuniculi*, *Neisseria elongata* subesp. *elongata*, *Neisseria elongata* subesp. *intermedia*, *Neisseria flava*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria perflava*, *Neisseria pharyngis* var. *flava*, *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria sicca*, *Neisseria subflava*, *Neisseria weaveri*, *Obesumbacterium proteus*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea dispersa*, *Paracoccus denitrificans*, *Pasteurella multocida*, *Pectinatus frisingensis*, *Peptococcus niger*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Phormidium ectocarpi*, *Pirellula marina*, *Planobispora rosea*,  
30 *Plesiomonas shigelloides*, *Plectonema boryanum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pragia fontium*, *Prevotella buccalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella oralis*, *Prevotella ruminicola*, *Prochlorothrix hollandica*, *Propionibacterium acnes*, *Propionigenium modestum*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri*, *Providencia rustigianii*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Psychrobacter phenylpyruvicum*, *Pyrococcus abyssi*, *Rahnella aquatilis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rhizobium leguminosarum*,  
35 *Rhizobium phaseoli*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus bromii*, *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis* subesp. *arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subesp. *choleraesuis*, *Salmonella choleraesuis* subesp. *diarizonae*, *Salmonella choleraesuis* subesp. *houtenae*, *Salmonella choleraesuis* subesp. *indica*, *Salmonella choleraesuis* subesp. *salamae*, *Serpulina hyodysenteriae*, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia odorifera*, *Serratia plymuthica*, *Serratia rubidaea*, *Shewanella putrefaciens*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Sinorhizobium meliloti*, *Spirochaeta aurantia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus*, *Staphylococcus auricularis*,  
40 *Staphylococcus capitis* subesp. *capitis*, *Staphylococcus cohnii* subesp. *cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hominis* subesp. *hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus sciuri* subesp. *sciuri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus wameryi*, *Stigmatella aurantiaca*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equi* subesp. *equi*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*,  
50 *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptomyces anbofaciens*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces cinnamomeus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces collinus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces netropsis*, *Streptomyces ramocissimus*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces venezuelae*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Synechococcus* sp., *Synechocystis* sp., *Tatumella ptyseos*, *Taxobacter* *occealus*, *Tetragenococcus halophilus*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermotoga maritima*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiomonas cuprina*, *Trabulsiella guamensis*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Veillonella parvula*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*,  
60 *Wolinella succinogenes*, *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas oryzae*, *Xenorhabdus bovienii*, *Xenorhabdus nematophilus*, *Yersinia bercovieri*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia rohdei*, *Yokenella regensburgei* y *Zoogloea ramigera*.

La presente invención se refiere a un método sencillo, rápido y eficaz de enriquecer y aislar células microbianas y sus ácidos nucleicos en una muestra biológica. El presente método requiere menos etapas de manipulación y ventajosamente permite el procesamiento sencillo de grandes volúmenes de muestra. Debido a la eficacia de los métodos de la presente invención en la concentración y purificación de microorganismos y/o sus ácidos nucleicos y

retirar inhibidores (inhibidores de la amplificación y/o detección), la muestra puede tener hasta 10 ml. A diferencia de métodos anteriores para lisis diferencial que emplean dilución de múltiples veces de la muestra, el método de la presente invención solo emplea la adición de un pequeño volumen (por ejemplo, de 1/5 a 1/100 del volumen inicial de la muestra de líquido corporal) de un agente de lisis químicamente bien definido (SDS). La concentración de SDS usada permite la lisis selectiva (diferencial) de células huésped (por ejemplo, glóbulos rojos y glóbulos blancos) al tiempo que mantiene la integridad de células microbianas sin impedir el posterior análisis de ácidos nucleicos. Preferiblemente, la concentración de SDS usada es lo suficientemente baja tras la purificación de ácido nucleico como para evitar cualquier inhibición de la amplificación.

Según la presente invención, las células huésped presentes en una muestra biológica incluyen cualquier célula endógena en un huésped dado, por ejemplo, un sujeto humano. Las células huésped presentes en muestras biológicas incluyen por ejemplo glóbulos rojos y glóbulos blancos en la sangre; células de vejiga, células de riñón y células de próstata en la orina, células epiteliales en la saliva, etc. Los términos "células huésped" y "células objeto" se usan en el presente documento de manera intercambiable.

En un aspecto de la misma, la divulgación se refiere a un método para aislar microorganismos y/o ácidos nucleicos de los microorganismos a partir de una muestra biológica que se sospecha que comprende microorganismos. El método comprende poner en contacto la muestra biológica con una disolución de lisis celular diferencial concentrada que comprende SDS en una cantidad suficiente para obtener una concentración final de entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 1% de SDS. Preferiblemente, la concentración final de SDS es de entre aproximadamente el 0,4% y aproximadamente el 0,75% de SDS. Más preferiblemente, la concentración final de SDS es de aproximadamente el 0,5%. En una realización particular, la disolución de lisis celular diferencial de la presente invención consiste esencialmente en SDS en agua o solución salina. La disolución de lisis celular diferencial se añade a la muestra durante un periodo de tiempo suficiente para someter a lisis las células del huésped (por ejemplo, glóbulos rojos y glóbulos blancos) contenidas en la muestra, al tiempo que se mantiene la integridad de células microbianas. Se sabe que SDS puede ser inhibidor en cuanto a la amplificación de ácidos nucleicos y es incompatible con el cultivo celular. Sin embargo, se encontró sorprendentemente que a bajas concentraciones de entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 1%, preferiblemente entre aproximadamente el 0,4 y aproximadamente el 0,75%, es extremadamente eficaz en la lisis de células del huésped (por ejemplo, glóbulos rojos y glóbulos blancos), al tiempo que deja las células microbianas intactas. Además, en las condiciones de la presente invención, SDS no es inhibidor en cuanto a las pruebas de ácido nucleico cuando se realiza una etapa de purificación de ácido nucleico y es compatible con el cultivo de células microbianas. Otra ventaja de SDS con respecto a otros reactivos de lisis tales como saponina es que está químicamente bien definido y es significativamente menos propenso a variaciones entre lotes.

Por tanto, según la presente invención, la etapa de poner en contacto la muestra biológica con una disolución de lisis celular diferencial para obtener una concentración final baja de SDS de entre aproximadamente el 0,1% y el 1% permite la lisis selectiva de las células huésped (por ejemplo, glóbulos rojos y glóbulos blancos) al tiempo que se mantiene la integridad y viabilidad de los microorganismos presentes en la muestra. Según la presente invención la expresión "mantener la integridad" en relación con células microbianas significa mantener ácidos nucleicos de células microbianas dentro de las células microbianas. Por ejemplo, en el caso de bacterias, la membrana celular y/o pared celular de bacterias debe estar lo suficientemente intacta como para mantener ácidos nucleicos bacterianos dentro de la célula. Según la presente invención, "microorganismos viables" son organismos que pueden experimentar división celular. "Organismos metabólicamente activos" son microorganismos que pueden llevar a cabo funciones metabólicas pero que es posible que no puedan necesariamente experimentar división celular (por ejemplo, pueden detectarse mediante análisis bioquímico).

La cantidad de muestra biológica usada según el método de la presente invención variará dependiendo del tipo de muestra que se evalúa para determinar la presencia de células microbianas. El método de la presente invención es particularmente útil para grandes volúmenes de muestras biológicas. Por ejemplo, pueden procesarse convenientemente 3, 4, 5 o incluso 10 ml de sangre sin necesidad de concentración previa de células sanguíneas. Esto es posible debido a la baja concentración de SDS requerida lo que reduce la dilución inicial de la muestra mediante la disolución de lisis. Por tanto, en un aspecto de la presente invención, se extrae la muestra biológica a partir de un sujeto y después se pone directamente en contacto con un pequeño volumen de una disolución de SDS (normalmente menos de 1 ml; menos de 750  $\mu$ l, preferiblemente menos de 500  $\mu$ l para una muestra de 10 ml, es decir, 1/20) para obtener una concentración final de entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 1% de SDS, preferiblemente entre aproximadamente el 0,4 y aproximadamente el 0,75% de SDS. En una realización, se extrae la muestra biológica a partir del sujeto y se pone directamente en un recipiente (tubo) que contiene una cantidad adecuada de una disolución de SDS de la presente invención para 1) minimizar las etapas de manipulación/procesamiento susceptibles de contaminar la muestra; y 2) reducir el tiempo de procesamiento para purificar los microorganismos o ácidos nucleicos microbianos que van a someterse a prueba.

Además de la disolución de lisis celular diferencial (para obtener una concentración final del 0,1-1% de SDS), pueden añadirse otros reactivos a la muestra biológica inicial, dependiendo de la naturaleza de la muestra y del análisis que va a realizarse.

Hay varios tipos de anticoagulantes, que difieren en cuanto a su mecanismo de acción y que necesitan seleccionarse cuidadosamente para evitar problemas con determinadas aplicaciones de laboratorio. La heparina se une a antitrombina III y acelera la inactivación de trombina y otros factores de coagulación. EDTA quelata metales, tales como calcio y magnesio, lo cual puede ser beneficioso para algunos ensayos basados en sangre, pero afectar de manera adversa a otros. Por ejemplo, en el caso de una muestra de sangre completa y de ensayos de amplificación, puede añadirse un agente anticoagulante tal como EDTA o heparina para prevenir la formación de coágulos de sangre. Como anticoagulante, EDTA es bien adecuado para ensayos basados en ADN, pero resulta problemático para análisis citogenéticos. A pesar de informes anecdóticos de problemas en ensayos de PCR, los estudios han encontrado generalmente que el uso de heparina o EDTA produce resultados equivalentes en ensayos de PCR. EDTA está disponible en forma de polvo, secado por pulverización o como disolución líquida en un tubo de recogida. El citrato ácido de dextrosa también quelata calcio. Se ha notificado que sangre estabilizada con citrato da como resultado ARN y ADN de mejor calidad que otros anticoagulantes (Vaught. Cancer epidemiology, Biomarkers and prevention 2006; 15(9): 1582-4).

Opcionalmente, puede añadirse un agente antiespumante a la muestra biológica. Estos agentes son aditivos químicos que ayudan a reducir la formación de espuma en la muestra que puede dificultar su procesamiento. Por ejemplo, en el caso de sangre, se piensa que la formación de espuma se produce como resultado de la agitación de la sangre y aire en presencia de albúmina presente en alta concentración en la sangre. Los ejemplos no limitativos de agentes antiespumantes incluyen silicona (por ejemplo, compuesto A, Dow Corning), simeticona (Dow) y lecitina. La adición de un agente antiespumante es particularmente útil cuando se usan perlas de vidrio durante la etapa de lisis y la muestra biológica es sangre.

En una realización particularmente ventajosa de la presente invención, las células huésped presentes en la muestra biológica se someten a lisis con una disolución que comprende una combinación de una baja concentración de SDS tal como se describe en el presente documento y perlas de vidrio. Preferiblemente, las perlas de vidrio consisten en una combinación de perlas de vidrio pequeñas y grandes que oscilan entre aproximadamente 150 y 212  $\mu\text{m}$  de diámetro y entre aproximadamente 710 y aproximadamente 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las perlas grandes pueden ser todas del mismo tamaño o pueden ser una combinación de perlas de diversos tamaños dentro del intervalo anteriormente indicado. De manera similar, las perlas pequeñas pueden ser todas del mismo tamaño o pueden ser una combinación de perlas de diversos tamaños dentro del intervalo anteriormente indicado. En una realización, la cantidad de perlas de vidrio usadas para una muestra de 10 ml es de aproximadamente 3 a 5 veces la combinación convencional de perlas de vidrio descrita en la patente estadounidense 7.494.771 (método de Ruclanap™). La combinación convencional de perlas de vidrio consiste en 40 mg +/- 20% de perlas de vidrio que oscilan entre aproximadamente 150 y aproximadamente 212  $\mu\text{m}$  y 15 mg +/- 35% de perlas de vidrio que oscilan entre aproximadamente 710 y aproximadamente 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por consiguiente, en una realización, la cantidad de perlas de vidrio usadas según la presente invención oscila entre 120 y 200 mg +/- 20% de perlas de vidrio que oscilan entre 150 y aproximadamente 212  $\mu\text{m}$  y de 45 a 75 mg +/- 35% de perlas de vidrio que oscilan entre aproximadamente 710 y aproximadamente 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro para un volumen de 10 ml de muestra biológica (por ejemplo, sangre completa). Se descubrió que las perlas de vidrio aumentan ventajosamente la eficacia de lisis de las células huésped y aumentan el rendimiento de microorganismos purificados. Sin limitarse a ninguna teoría particular, se cree que la adición de perlas de vidrio aumenta la eficacia del método de la presente invención mejorando el mezclado de la muestra, aumentando la lisis de células huésped más grandes (por ejemplo, glóbulos blancos), protegiendo células microbianas en etapas posteriores del procedimiento de procesamiento de muestras y mejorando la recuperación de microorganismos.

Una vez que se añade la disolución de lisis celular diferencial a la muestra biológica con, opcionalmente, otros reactivos tales como un agente antiespumante, un anticoagulante y perlas de vidrio, se mezcla la muestra biológica a baja velocidad (por ejemplo, en un agitador horizontal a entre aproximadamente 150 y aproximadamente 200 rpm, preferiblemente a aproximadamente 170 rpm) durante un periodo de tiempo suficiente para someter a lisis las células presentes en la muestra biológica al tiempo que se conservan las células microbianas. Normalmente la cantidad de tiempo requerida es de aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. Evidentemente, pueden requerirse periodos de tiempo más cortos o más largos dependiendo del tipo de muestra biológica que va a procesarse, su volumen, así como el tipo de células microbianas que van a someterse a lisis y la presencia de reactivos adicionales en la muestra (por ejemplo, perlas de vidrio). Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de tiempo óptima requerida para someter a lisis una muestra biológica dada según la presente invención.

Una vez que se han sometido a lisis las células huésped, se concentran microorganismos en la muestra biológica sometida a lisis y se separan de las células huésped sometidas a lisis. También pueden extraerse desechos celulares residuales con las células microbianas. Los desechos celulares residuales incluyen células huésped residuales que no se someten a lisis. Por ejemplo, en el caso de muestra de sangre completa, los desechos celulares residuales pueden incluir una pequeña cantidad de plaquetas y glóbulos blancos y glóbulos rojos residuales. Esta cantidad residual es generalmente muy pequeña ya que la gran mayoría de las células huésped se someten normalmente a lisis de manera eficaz mediante la disolución de lisis celular diferencial de la presente invención. Por ejemplo, en el caso de una muestra de sangre completa, más del 99%, y con frecuencia más del

99,99% de los glóbulos rojos y glóbulos blancos (incluyendo macrófagos) se someten a lisis mediante la disolución de lisis celular diferencial de la presente invención, tras el mezclado a baja velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por tanto, la disolución de lisis diferencial de la presente invención es extremadamente eficaz.

5 La concentración de células microbianas y la separación a partir de componentes de lisis celular pueden lograrse preferiblemente mediante una única centrifugación durante un tiempo suficiente para sedimentar los microorganismos (por ejemplo, aproximadamente 5 min a aproximadamente 3200-10000g) usando una centrifugadora clínica de alta velocidad convencional. La etapa de centrifugación se realiza preferiblemente a  
10 temperatura ambiente para evitar la precipitación del SDS en disolución.

Tal como se indicó anteriormente, los microorganismos se separan preferiblemente a partir de componentes de células huésped sometidas a lisis usando una única centrifugación. Se prefiere la centrifugación en una cubeta  
15 oscilante porque el sedimento se ubica entonces en el fondo del tubo y puede separarse más fácilmente del sobrenadante. Cuando se usa centrifugación para separar células microbianas a partir de componentes de células sometidas a lisis, se desecha el sobrenadante. El sobrenadante se retira preferiblemente con alteración mínima de las células microbianas sedimentadas. Se encontró preferible mantener una pequeña cantidad de sobrenadante sobre la superficie del sedimento para reducir la pérdida de células microbianas. Se mostró que un dispositivo de vacío, diseñado por el solicitante y representado en la figura 1, aumentaba la eficacia del método dejando solo la  
20 cantidad correcta de sobrenadante sobre la superficie del sedimento. De esta manera, microorganismos presentes en la muestra biológica se concentran para dar un volumen de muestra significativamente reducido. Después se resuspende el sedimento en un pequeño volumen de agua, solución salina, medio de cultivo o cualquier tampón (por ejemplo, PBS, TE) compatible con el método de análisis de ácido nucleico seleccionado. Opcionalmente puede realizarse una o más etapas de lavado, pero se encontró que no era necesario para el cultivo eficaz adicional y la  
25 amplificación de ácidos nucleicos. Por tanto, dependiendo del análisis posterior que va a realizarse pueden usarse una o más etapas de lavado según la presente invención.

Los microorganismos aislados pueden someterse entonces a lisis adicional para extraer sus ácidos nucleicos o cultivarse en un medio apropiado para pruebas adicionales. Por consiguiente, puede usarse la muestra completa o  
30 una fracción de la misma para el análisis de ácido nucleico y/o cultivo de las células microbianas. Si solo van a realizarse análisis de ácido nucleico, puede usarse el sedimento completo que comprende las células microbianas concentradas para la extracción y análisis de ácidos nucleicos adicional. Alternativamente, puede usarse una porción del sedimento para cultivo y una porción para el análisis de ácido nucleico, permitiendo así realizar de  
35 manera simultánea ambos procedimientos y con una única muestra biológica.

Pueden someterse a lisis microorganismos aislados para extraer y/o purificar sus ácidos nucleicos mediante cualquier medio conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, mediante lisis química, enzimática y/o  
40 mecánica). Según una realización preferida de la presente invención, la lisis de las células microbianas se lleva a cabo mediante métodos mecánicos. Un método de extracción de ácido nucleico a modo de ejemplo es el kit de lisis BD Gene-Ohm™. Un método de lisis preferido se describe en la patente estadounidense 7.494.771, que usa partículas de lisis tales como perlas de vidrio de diversos diámetros para someter a lisis las células y extraer ADN.

Tal como se indicó anteriormente, se encontró que la adición de una combinación de perlas de vidrio pequeñas y grandes junto con la disolución de SDS de la presente invención durante la lisis selectiva de células huésped en la  
45 muestra mejoraba la lisis de células huésped selectiva, protegía células microbianas y aumentaba la recuperación de células microbianas. Estas perlas de vidrio, que permanecen con las células microbianas, pueden usarse adicionalmente para someter a lisis células microbianas una vez que se han separado de componentes de lisis de células huésped mediante centrifugación. Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, una combinación de perlas de vidrio pequeñas y grandes que oscilan entre aproximadamente 150 y aproximadamente  
50 212  $\mu\text{m}$  de diámetro y entre aproximadamente 710 y aproximadamente 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro, respectivamente, se usan para someter a lisis mecánica las células microbianas. Preferiblemente, los microorganismos se someten a lisis resuspendiendo el sedimento obtenido tras la centrifugación en un pequeño volumen de disolución de extracción tal como solución salina tamponada con fosfato (por ejemplo, PBS, 100  $\mu\text{l}$ ). Entonces la suspensión que contiene las perlas de vidrio y células microbianas puede agitarse con vórtex a alta velocidad durante un tiempo suficiente para  
55 someter a lisis las células microbianas y liberar su ADN en disolución. Normalmente, el tiempo requerido es de entre aproximadamente 3-7 minutos. Generalmente, se encontró que agitar con vórtex la muestra durante aproximadamente 5 minutos es suficiente para someter a lisis las células microbianas.

Una vez que las células microbianas han liberado su ADN en disolución, ventajosamente puede realizarse una etapa de calentamiento para inactivar los inhibidores de la amplificación (por ejemplo, inhibidores restantes tales como proteasas microbianas). Normalmente, calentar la muestra a 95°C durante aproximadamente 5 minutos es suficiente para inactivar la mayoría de los inhibidores de la amplificación. Esta etapa es particularmente útil en el caso en el que se realiza lisis mecánica de células microbianas (por ejemplo, usando perlas de vidrio + vórtex). En el caso en el que se usan otros métodos de lisis celular, la etapa de calentamiento puede no proporcionar ninguna ventaja  
65 adicional.

En una realización de la presente invención, y preferiblemente en el caso en el que no se añaden perlas de vidrio en la etapa de lisis de células huésped diferencial inicial, las células microbianas pueden someterse a lisis y extraerse su ADN mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede usarse la digestión enzimática de células microbianas. Tal como se conoce en la técnica, la presencia de proteínas, lípidos, polisacáridos y algunos otros compuestos orgánicos o inorgánicos en la preparación de ácido nucleico puede interferir con métodos de análisis de ácido nucleico, especialmente con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por tanto, el método de lisis de células microbianas se seleccionará basándose en el tipo específico de análisis de ácido nucleico posteriormente realizado (por ejemplo, método de amplificación, hibridación, etc.) y el tipo de célula microbiana que va a detectarse, especialmente cuando los ácidos nucleicos liberados van a usarse directamente, sin etapas de purificación adicionales.

Por tanto, según una realización adicional de la presente invención, la lisis de las células microbianas según el método de la presente invención se lleva a cabo de manera enzimática. Dependiendo del microorganismo particular que va a detectarse, puede seleccionarse una enzima que conduce a la alteración de la pared celular o la otra estructura de límite. Por ejemplo, puede usarse lisozima para la lisis de la mayor parte de los procariotas, líticas para levaduras, quitinasas para hongos, celulasas para algas y proteasas para protozoos. Otro ejemplo es la acromopeptidasa bien conocida que tiene una potente actividad bacteriolítica para bacterias gram positivas anaerobias y aerobias incluyendo algunas que son resistentes a lisozima. Evidentemente, pueden usarse diversas combinaciones de enzimas según la presente invención. Además, si, por ejemplo, van a someterse a lisis bacterias con una estructura de pared celular no habitual, pueden usarse otras enzimas según el método de la presente invención, por ejemplo, lisostafina para disolver la pared celular de estafilococos. Además, pueden usarse proteasas en la lisis tanto de células procariotas microbianas como de células eucariotas microbianas. Evidentemente, la lisis de células microbianas también puede llevarse a cabo mediante un método que comprende tratamientos tanto mecánicos como enzimáticos.

En el caso en el que se someten a lisis células microbianas de manera enzimática, el tampón en el que se resuspenden las células microbianas concentradas será el tampón apropiado para una actividad enzimática óptima (por ejemplo, Tris 1 mM, EDTA 1 mM, pH 8 para acromopeptidasa). En la técnica se conocen bien tampones de lisis apropiados para alteración enzimática. En el caso de alteración enzimática usando acromopeptidasa, el sedimento que comprende células microbianas y desechos celulares residuales se altera reduciendo la etapa de agitación con vórtex hasta aproximadamente 1 minuto a alta velocidad en lugar de los aproximadamente 5 minutos usados normalmente para alteración mecánica usando perlas de vidrio. Por tanto, el experto en la técnica adaptará las etapas de lisis microbiana según el método específico seleccionado.

Después pueden usarse directamente los ácidos nucleicos microbianos en disolución para el análisis de ácido nucleico o concentrarse y purificarse adicionalmente. Por ejemplo, puede usarse directamente una alícuota de las células microbianas sometidas a lisis en disolución para la amplificación de ácido nucleico. Alternativamente, después pueden purificarse los ácidos nucleicos microbianos en disolución mediante cualquier método y kit conocidos adecuados. Preferiblemente, los ácidos nucleicos microbianos se purifican usando agentes de unión a ADN en fase sólida (por ejemplo, el instrumento Roche MagNapur™ Compact usando la técnica de Boom *et al.* (perlas magnéticas); perla Handilab™; kits de Qiagen, sistema BD MAX™, etc.). Tal como se conoce bien en la técnica, algunas técnicas de purificación de ADN pueden reducir la sensibilidad de pruebas de ácido nucleico al introducir sustancias inhibidoras. Por ejemplo, los kits de purificación ISOQUICK™ y GNOME™ dan como resultado preparaciones de ácido nucleico aislado que son altamente inhibidoras en reacciones de amplificación. Además, pueden reducir la calidad de ácidos nucleicos conduciendo a su vida útil en almacenamiento más corta. Por tanto, el método de extracción de ácido nucleico se seleccionará basándose en muchos factores (por ejemplo, tipo de método de análisis de ácido nucleico incluyendo método de amplificación, tipo de célula microbiana que va a detectarse, etc.). Ejemplos no limitativos de métodos de extracción de ácido nucleico incluyen extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, métodos basados en proteinasa K, resina de intercambio iónico Chelex, resinas o matrices (columnas) de perlas de sílice, resinas líquidas, perlas magnéticas, etc. Un método preferido de lisis y/o purificación de ácidos nucleicos microbianos según la presente invención emplea un sistema automatizado tal como el sistema BD MAX™. Este sistema permite automatizar completamente la lisis celular, la extracción de ácido nucleico y/o la configuración, amplificación y detección de PCR.

Una vez purificados los ácidos nucleicos, la muestra puede usarse para un protocolo de análisis o detección de ácido nucleico seleccionado. Los ácidos nucleicos preparados según los métodos de la presente invención son compatibles con cualquiera de los protocolos de análisis y detección de ácido nucleico conocidos, pero los métodos de la invención tienen ventajas particulares (por ejemplo, rendimiento aumentado, retirada de inhibidores de la amplificación y detección, rapidez, etc.) en la preparación de ácidos nucleicos para su uso en análisis enzimáticos. Estas incluyen, pero no se limitan a, digestión por restricción y clonación, secuenciación de nucleótidos y amplificación de ácido nucleico. Tales protocolos se conocen bien en la técnica y se revisan en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición, de J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 así como en CSH Protocols, Cold Spring Harbor Laboratory Press, www.cshprotocols.org. Los presentes métodos de procesamiento de muestras son particularmente útiles para la amplificación de ácidos nucleicos porque la eliminación de inhibidores potencia la sensibilidad de pruebas de diagnóstico y permite al técnico amplificar una mayor cantidad de ADN microbiano porque se procesa rápidamente un volumen inicial más grande de

muestra biológica con un mínimo de etapas de procesamiento, aumentando adicionalmente el rendimiento de purificación. Por tanto, es más probable que una secuencia objetivo que es extremadamente poco frecuente esté representada en la alícuota de muestra amplificada, mejorando la precisión y fiabilidad de la reacción de amplificación.

5 El aislamiento de microorganismos y ácidos nucleicos de los microorganismos según el método de la presente invención puede dar como resultado una concentración de 15 a 50 veces concentración de microorganismos y ácidos nucleicos de los microorganismos a partir de la muestra biológica. Los microorganismos pueden estar presentes a una concentración alta o baja en una muestra biológica. Normalmente, la concentración de un  
10 microorganismo en una muestra biológica puede medirse mediante cuentas de UFC que expresan el número de células microbianas viables por mililitro. Una concentración baja a modo de ejemplo de microorganismos en una muestra biológica es de 10 UFC/ml o menos. Ejemplos no limitativos incluyen de 0,1 a 10 UFC/ml y cualquier intervalo entre medias o incluso menos. Ejemplos no limitativos de una concentración de microorganismo alta en una muestra biológica incluyen entre 100-10.000 UFC/ml o más. La cantidad de células microbianas que pueden detectarse según el método de la presente invención es de tan solo 2,2 UFC/ml y en condiciones óptimas y  
15 dependiendo del tipo de microorganismo incluso 1 UFC o menos.

#### Kits

20 La presente invención también proporciona un kit para concentrar y aislar microorganismos y/o ácidos nucleicos de los microorganismos a partir de una muestra biológica de un sujeto que se sospecha que comprende microorganismos según el método de la presente invención. El kit puede comprender un recipiente que contiene una disolución de lisis diferencial que comprende (o que consiste esencialmente en) de aproximadamente el 1% a  
25 aproximadamente el 20% de SDS, preferiblemente entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 15% de SDS y de manera incluso más preferible aproximadamente el 10% de SDS, y/o uno o más recipientes que comprenden reactivos de extracción, purificación y/o detección de ácido nucleico. Preferiblemente, el kit puede comprender además una combinación de perlas de vidrio tales como la descrita en la patente estadounidense 7.494.771 (método Ruclanap™). La cantidad de perlas de vidrio consiste preferiblemente en 3-5 veces la combinación convencional de perlas de vidrio pequeñas y grandes (la combinación convencional es de 40 mg +/-  
30 20% de perlas que oscilan entre aproximadamente 150 y aproximadamente 212  $\mu\text{m}$  y 15 mg +/- 35% de perlas que oscilan entre aproximadamente 710 y aproximadamente 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro, véase Ruclanap™, patente estadounidense n.º 7.494.771) pero pueden usarse otras cantidades y combinaciones.

35 El kit puede comprender además otros reactivos adecuados para procesar una muestra biológica dada tal como un anticoagulante y/o un agente antiespumante. El kit también puede comprender opcionalmente un tubo de recogida para recoger la muestra biológica. El tubo de recogida puede comprender ya i) un anticoagulante (por ejemplo, EDTA); ii) disolución de lisis celular diferencial según la presente invención; iii) agente antiespumante; o iv) cualquier combinación de i) a iii). El kit comprende preferiblemente además instrucciones para aislar células microbianas y/o ácidos nucleicos microbianos a partir de una muestra biológica. Pueden añadirse otros reactivos según el tipo de  
40 muestra biológica que va a procesarse o las células microbianas o ácidos nucleicos microbianos que van a detectarse (por ejemplo, reactivos de cultivo de células bacterianas adecuados; cebadores y/o sondas para detectar uno o más microorganismos específicos, etc.).

45 Los siguientes ejemplos experimentales se proporcionan para ilustrar determinadas realizaciones de la invención, pero no deben interpretarse como limitativos de la invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

#### Ejemplo 1

##### Material y métodos

50 Cepas, almacenamiento y condiciones de crecimiento. La especie bacteriana usada como modelo en los siguientes experimentos es *Staphylococcus aureus* (ATCC 36232). Se mantuvieron las cepas criopreservadas en glicerol al 50% a -80°C. Se cultivaron células bacterianas a 35°C en placas de agar con sangre (Quelab, Montreal). Tras la incubación durante la noche, se transfirieron tres colonias a 10 ml de caldo de soja tríptico (TSB) y se incubaron durante la noche y se usaron como cultivo en fase estacionaria. Se determinó el número de bacterias viables mediante el método de placa extendida convencional.  
55

60 Donaciones de sangre. Se extrajeron donaciones de sangre en el Minnesota Memorial Blood Center y se mantuvieron a 4°C. Tras pruebas habituales para determinar la presencia de VHB, VIH, STS y VHC, se dio el visto bueno a la bolsa de sangre y se envió a la instalación de INO (GSI-Qc) en una caja aislada enfriada con paquetes de hielo. Tras recibirse, se mantuvo la sangre a 4°C hasta su uso. La donación de sangre tenía una antigüedad de 2-4 semanas cuando se sometió a prueba. Se dispensó la bolsa de sangre en alícuotas de 50 ml en tubos Falcon™ de 50 ml y se almacenó a 4°C. Se sometió a prueba una alícuota de 10 ml de sangre en el cultivo de sangre (botella de SA aerobia normal y botella de FA en BacTAlert™ 3D) para cada bolsa para detecta la posible contaminación por  
65 bacterias cultivables.

## Ejemplo 2

Nuevo protocolo de lisis diferencial para concentrar células microbianas a partir de grandes volúmenes de muestra de sangre

5 Se transfirió una muestra de sangre fresca con K3-EDTA (K3-EDTA usado como disolución de EDTA líquida) de 5-10 ml a tubos de 10 ml Sarstedt™ con fondo redondo que contenían el equivalente a tres veces la matriz de lisis contenida en un tubo de lisis IDI (tubo de lisis BD GeneOhm, n.º de cat. 441243), el 0,1% de SDS como agente de lisis de células sanguíneas y el 0,005% de silicona como agente antiespumante. Después se agitó cada tubo a 10 170 rpm durante 5 min a 25°C sobre un agitador horizontal. Tras esta etapa de lisis de células sanguíneas, se centrifugaron muestras de sangre a 3200 x g durante 7 min a temperatura ambiente.

15 Se descartó el sobrenadante mediante aspiración usando el dispositivo mostrado en la figura 1. Se dejó un pequeño volumen de líquido sobre el sedimento de células microbianas, desechos celulares y matriz de extracción. Se añadió un volumen de 100 µl de PBS antes de realizar la lisis de bacterias mediante agitación con vórtex durante 5 min a alta velocidad con un dispositivo Vortex Genie™ convencional con un adaptador de múltiples tubos. Tras la lisis, después se transfirió el extracto líquido (aproximadamente 400 µl) a un microtubo de 2 ml insertado en el instrumento MagNAPure™ Compact (MPC). Se realizó la purificación de ADN en el instrumento MPC usando el protocolo "DNA Blood 100\_400 V3.1", con un volumen de elución de 100 µl. Se cambió el tampón de elución del kit 20 MagnaPure™ por tampón TE convencional (tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) ya que aumentó la cantidad de volumen de ADN que podía usarse en PCR (desde 3 µl hasta 17 µl) al reducir la presencia de sustancias inhibitoras en disolución. Parece que el agua tamponada suministrada en el kit contenía contaminantes plásticos del tubo en el que se almacena que inhiben la PCR.

25 La figura 1 resume el nuevo protocolo para la lisis diferencial y purificación de ácidos nucleicos a partir de microorganismos.

## Ejemplo 3

30 Comparación del rendimiento de procesamiento de muestras en volúmenes de muestra de sangre de entre 10 ml y 5 ml

El objetivo de este experimento era determinar si procesar 10 ml de muestras de sangre podía proporcionar resultados similares o mejores a usar muestras de sangre de 5 ml. Se realizaron cuatro experimentos con cuatro 35 donaciones de sangre diferentes (E31: 1472658, E34: 1475067, E37: 1477263 y E39: 1482868) según el procedimiento general descrito en el ejemplo 1. Se realizaron adiciones conocidas en muestras de sangre de 5 ó 10 ml con aproximadamente 100 UFC/volumen para permitir la comparación.

40 Después se analizó ADN purificado con MPC mediante PCR en tiempo real, en placas de 96 pocillos, en un instrumento MiQ™ (BioRad). Se preparó PCR Mastermix™ (MM) como disolución 4X. Se amplificó *S. aureus* usando un conjunto de cebadores específicos del género (TstaG\_422 (GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATCA (SEQ ID NO: 1)) y TstaG\_765 (TIACCATTTCAGTACCTTCTGGTAA) (SEQ ID NO: 2)) sin control interno. El volumen de 45 reacción final era de 25 µl. Se añadió muestra a dos volúmenes (4,7 µl y 18,8 µl) a 6,25 µl de 4X MM con un volumen de agua para completar hasta 25 µl por duplicado para cada purificación de ADN. Se analizaron el umbral de ciclo, punto final y altura de pico de fusión.

Resultados. La enumeración de inóculo de *S. aureus* para los diversos experimentos dio respectivamente 71 UFC (E31), 303 UFC (E34), 156 UFC (E37) 234 y 340 UFC (E39). Se generaron mensajes de "error por coágulo" durante 50 extracciones con MPC. Todas las muestras con de 70 a 340 UFC de *S. aureus* se detectaron eficazmente con pocas excepciones (figura 2, por ejemplo, muestras con 16 UFC en E39). CT no siempre era proporcional a la carga inicial. Sin embargo, el CT se redujo tal como se esperaba al aumentar el volumen de muestra en PCR. En la mayoría de los casos, el CT obtenido a partir de las muestras de sangre era muy similar a los obtenidos con ADN convencional. El experimento E39 condujo a CT retrasado y fallo de PCR en la muestra más baja en PCR. Esto puede ser 55 atribuible a un coágulo de muestra que puede dificultar el rendimiento de purificación con MPC (véase la figura 2).

## Ejemplo 4

60 Pruebas del protocolo de lisis diferencial para concentrar células microbianas con muestras de sangre fresca de 10 ml

Se usaron donaciones de sangre como sistema de modelo para facilitar la viabilidad, pero la muestra objetivo es en última instancia sangre fresca. Por tanto, se extrajo sangre completa fresca en K3-EDTA (BD-vacutainer™) y se realizaron adiciones conocidas con un cultivo en mitad de fase logarítmica de *S. aureus* de aproximadamente 200 UFC/10 ml de sangre y 40 UFC/10 ml de sangre (por triplicado). Después se sometieron muestras de sangre 65 con adiciones conocidas al protocolo de lisis diferencial descrito en el ejemplo 2.

Para evaluar la eficacia de lisis, se cargó la carga bacteriana más alta (200 UFC/50 µl en tampón TE) procedente del mismo cultivo en tubo de lisis IDI en 2 repeticiones. Esta extracción directa permite la eliminación de los efectos de sangre, detergente, antiespumante, centrifugación y desechos de sangre sobre el rendimiento de detección.

Para los tubos de lisis IDI con adiciones conocidas, se añadió una etapa de calentamiento a 95°C a los 5 minutos de agitación con vórtex para seguir el método del kit de lisis IDI. Tras la lisis, se añadió PBS para completar el volumen hasta 400 µl, lo cual se transfirió después a un microtubo de 2 ml insertado en el MPC. Se realizó la purificación de ADN con MagNAPure™ con un volumen de elución de 100 µl. El ADN resultante se denominó lisado crudo purificado (PCL). Después se analizaron los ADN purificados mediante PCR en tiempo real por duplicado, según el método del ejemplo 3.

Resultados. La enumeración de inóculos de *S. aureus* dio respectivamente 234 y 47 UFC en lugar de las cargas estimadas de 200 y 40 UFC. Los resultados de PCR indican que 47 UFC de *S. aureus* como adición conocida en 10 ml de sangre completa pueden aislarse, extraerse, purificarse su ADN y detectarse mediante PCR de manera eficaz (figura 3). Se detectaron todas las repeticiones (6/6) del volumen de 18,8 µl añadido a PCR que representan el ADN equivalente a 8,8 UFC si se supone un rendimiento del 100% para el procedimiento entero. Además, se detectaron 5/6 repeticiones de los 9,4 µl que representan el ADN equivalente a 4,4 UFC, y 2/6 de los 4,7 µl que representan el ADN equivalente a 2,2 UFC. La media de CT fue significativamente superior a la media de CT de ADN de control, demostrando un rendimiento ligeramente variable. Además, el EP y la altura de pico de fusión de las muestras fueron siempre inferiores al ADN de control característico de la presencia de algunos inhibidores residuales en las muestras (figura 3).

La comparación de los resultados de PCR entre el procesamiento de muestras y la lisis en bruto directa mostró una diferencia de 1,5 a 2 ciclos, lo que significa que el rendimiento de procesamiento de muestras podía oscilar entre el 25-35%.

#### Bibliografía

1. Johnson *et al.*, 1993, APMIS, 101:595-601;
2. White *et al.*, 2006, Clin. Infect. Dis. 42:479-486;
3. Vaught., 2006, Cancer epidemiology, Biomarkers and prevention 15(9):1582-4.

#### Lista de secuencias

<110> GENE OHM SCIENCES CANADA INC.

Menard, Christian  
Roy, Annie  
Boucher, Patrick  
Letourneau, Steve

<120> ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE CÉLULAS MICROBIANAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS MICROBIANOS A PARTIR DE UNA MUESTRA BIOLÓGICA

<130> 14168.136

<140> N/A

<141> 20-12-2012

<150> US 61/578.352

<151> 21-12-2011

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético (*Staphylococcus aureus*)

ES 2 749 351 T3

<400> 1

5     **ggccgtgttg aacgtggtca aatca** 25

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> (2)..(2)

<223> n = inosina

20 <400> 2

**tnaccatttc agtaccttct ggtaa** 25

**REIVINDICACIONES**

1. Método para procesar una muestra biológica que contiene células de un sujeto para el análisis de ácido nucleico de células microbianas en la muestra biológica que comprende, o que consiste esencialmente en:
  - i) poner la muestra biológica obtenida de un sujeto directamente en contacto con un pequeño volumen menor de 1 ml de una disolución de lisis celular diferencial que consiste esencialmente en SDS en agua o solución salina para obtener una concentración final del 0,1 al 1% de SDS en dicha muestra y opcionalmente un agente antiespumante y/o un anticoagulante, en el que el volumen inicial de muestra biológica es mayor de 3 ml;
  - ii) mezclar la disolución obtenida en la etapa i) durante un periodo de tiempo suficiente para someter a lisis las células objeto presentes en la muestra biológica, al tiempo que se conserva la integridad de las células microbianas; y
  - iii) separar las células microbianas de los componentes de células objeto sometidas a lisis, en el que la etapa iii) consiste en una única centrifugación, seguida por retirada del sobrenadante y resuspensión de las células microbianas,

en el que las células objeto son glóbulos rojos y glóbulos blancos en la sangre; células de vejiga, células de riñón y células de próstata en la orina, o células epiteliales en la saliva.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha resuspensión de las células microbianas se realiza en de 1/10 a 1/100 del volumen inicial de muestra biológica.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dichas células microbianas se resuspenden en una disolución que consiste esencialmente en agua, solución salina, medio de cultivo o un tampón compatible con la extracción y análisis de ácido nucleico.
4. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que dicha centrifugación se realiza entre 3200g y 10000g.
5. Método según la reivindicación una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa i) comprende además añadir una combinación de perlas de vidrio grandes que oscilan entre 710 y 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro y de perlas de vidrio pequeñas que oscilan entre 150 y 212  $\mu\text{m}$  de diámetro, en el que la combinación de perlas de vidrio consiste en de 3 a 5 veces la combinación convencional de perlas de vidrio y en el que la combinación convencional de perlas de vidrio es:
  - i. 40 mg +/- 20% de perlas que oscilan entre 150 y 212  $\mu\text{m}$ ; y
  - ii. 15 mg +/- 35% de perlas que oscilan entre 710 y 1180  $\mu\text{m}$ .
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la etapa iv) que consiste en someter a lisis células microbianas para liberar sus ácidos nucleicos en disolución mediante:
  - i) lisis mecánica; o
  - ii) digestión enzimática.
7. Método según la reivindicación 6, que comprende además la etapa v) que comprende purificar ácidos nucleicos liberados a partir de las células microbianas.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre completa, que comprende opcionalmente un anticoagulante.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha concentración final de SDS es de entre el 0,4 y el 0,75%.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha concentración final de SDS es de entre el 0,4 y el 0,5%.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha concentración final de SDS es del 0,5%.
12. Uso de un kit para poner en práctica el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende:

i) una disolución de lisis celular diferencial que consiste esencialmente en del 1 al 20% de SDS como agente de lisis y al menos uno de:

5

ii) uno o más reactivos para la extracción de ácido nucleico microbiano;

iii) uno o más reactivos para la purificación de ácido nucleico microbiano;

iv) uno o más reactivos para la detección de células microbianas o ácido nucleico microbiano;

10

v) un anticoagulante;

vi) un agente antiespumante; e

15

vii) instrucciones para poner en práctica el método.

13. El uso de un kit según la reivindicación 12, en el que ii) comprende una combinación de perlas de vidrio que consiste en de 3 a 5 veces la combinación convencional de perlas de vidrio, en el que la combinación de perlas de vidrio consiste en una combinación de perlas de vidrio grandes que oscilan entre 710 y 1180  $\mu\text{m}$  de diámetro y de perlas de vidrio pequeñas que oscilan entre 150 y 212  $\mu\text{m}$  de diámetro; y en el que la combinación convencional de perlas de vidrio es:

20

i. 40 mg +/- 20% de perlas que oscilan entre 150 y 212  $\mu\text{m}$ ; y

ii. 15 mg +/- 35% de perlas que oscilan entre 710 y 1180  $\mu\text{m}$ .

25

14. El uso de un kit según la reivindicación 12 o 13, en el que ii) comprende acromopeptidasa y iii) comprende perlas magnéticas.

### Procesamiento de muestras de sangre con adición conocida, semiautomatizado

Recogida de 5-10ml, lisis previa, lisis, purificación de ADN (sept. 06)

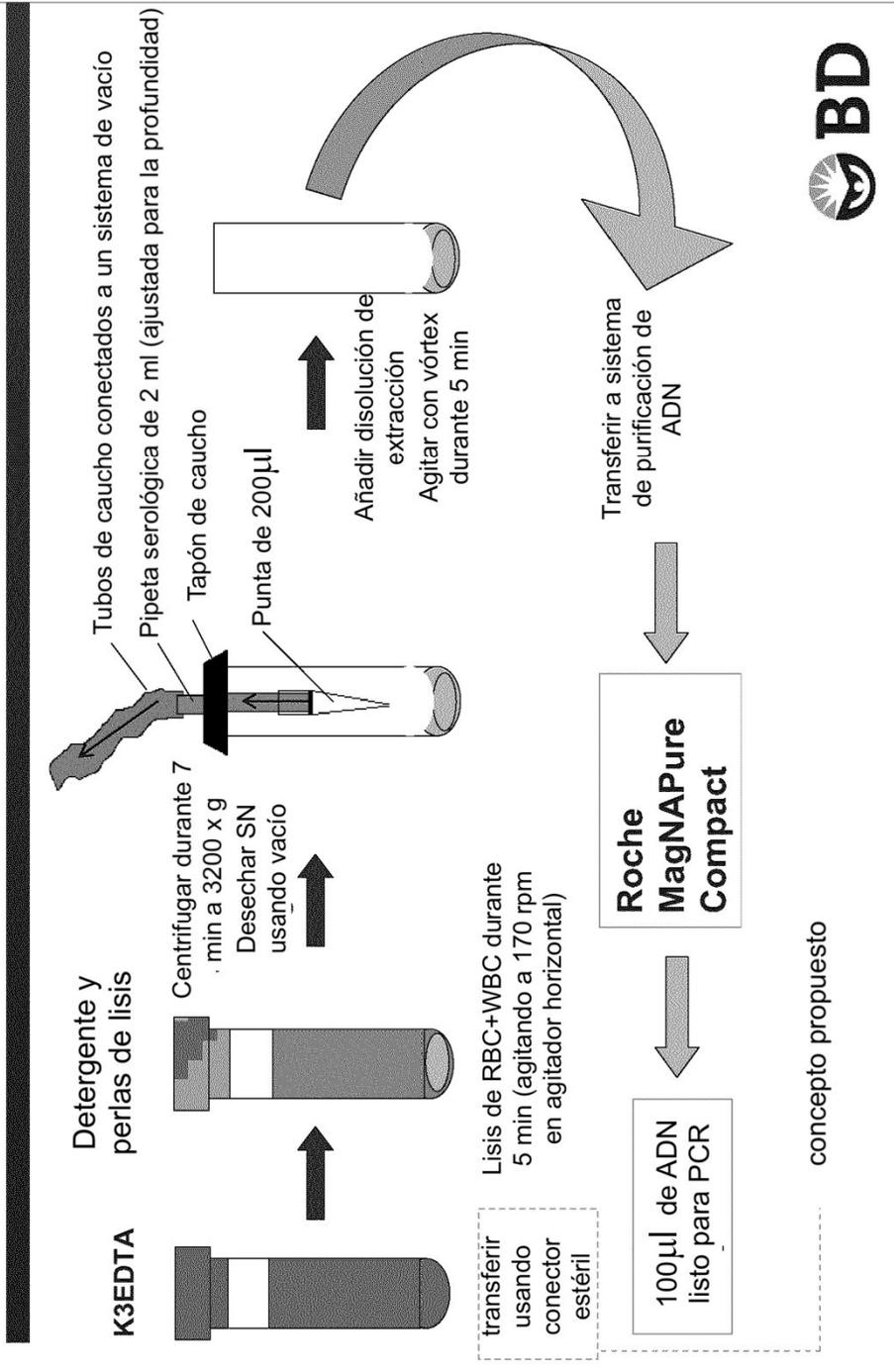


Figura 1

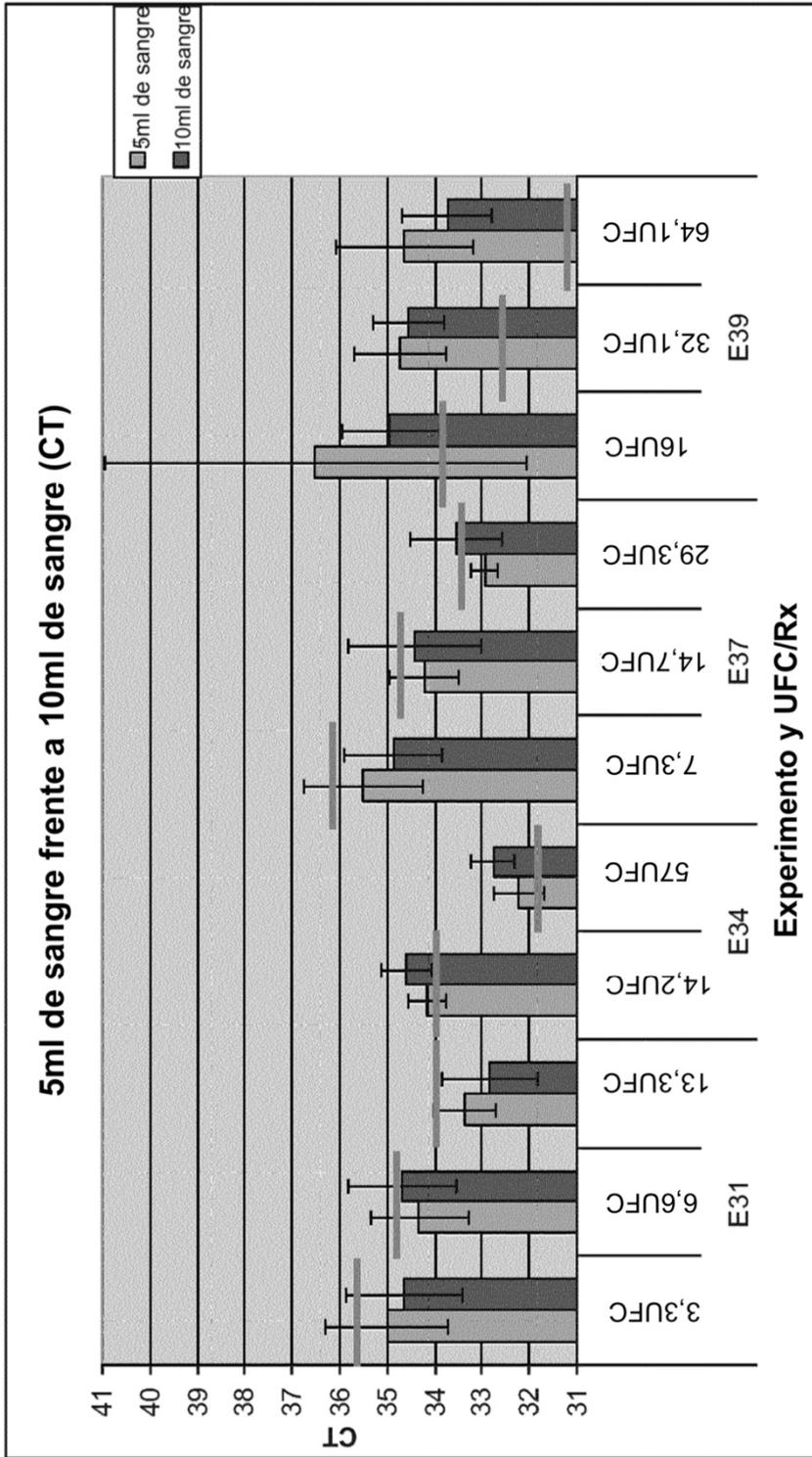


Figura 2A

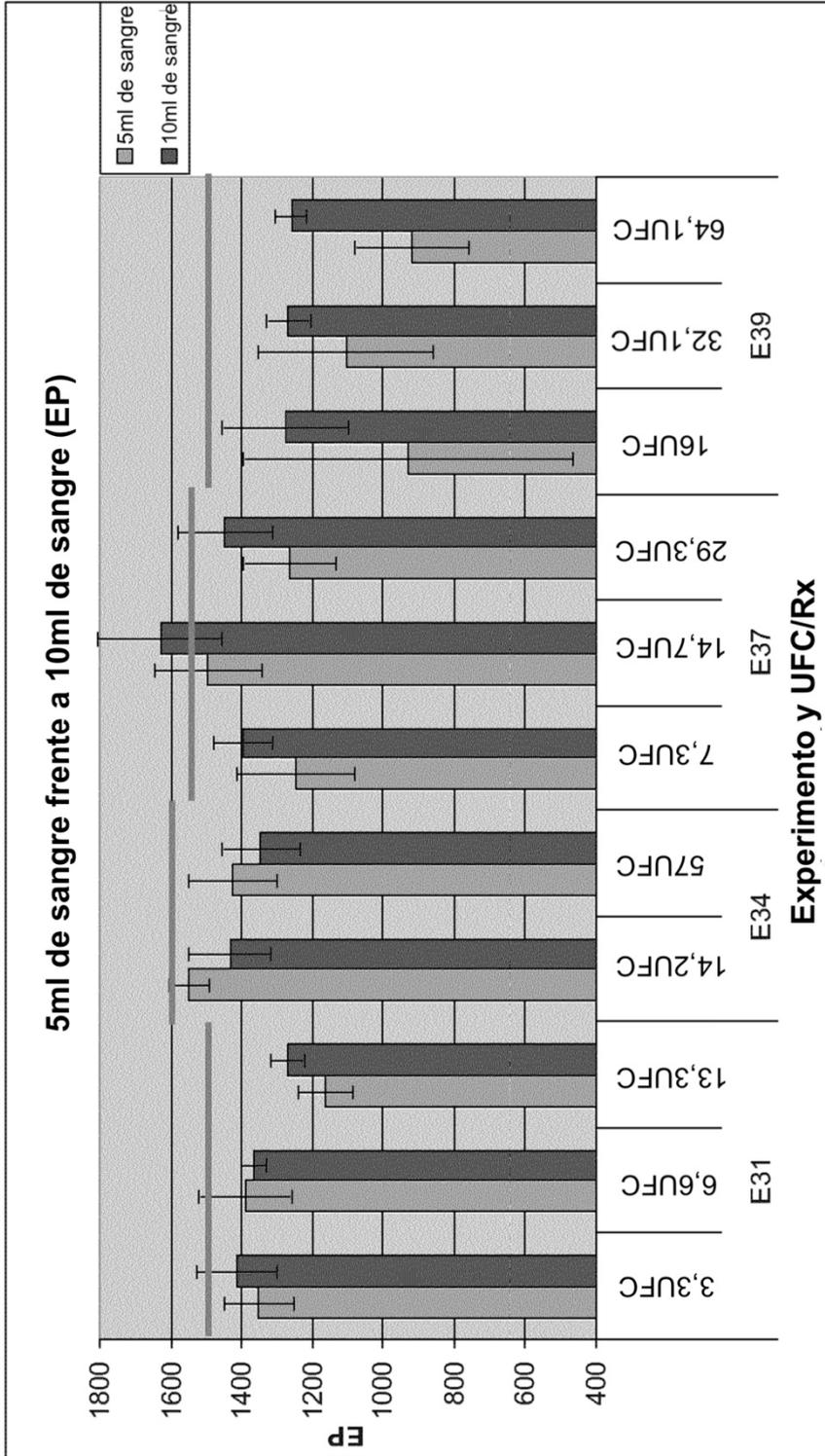


Figura 2B

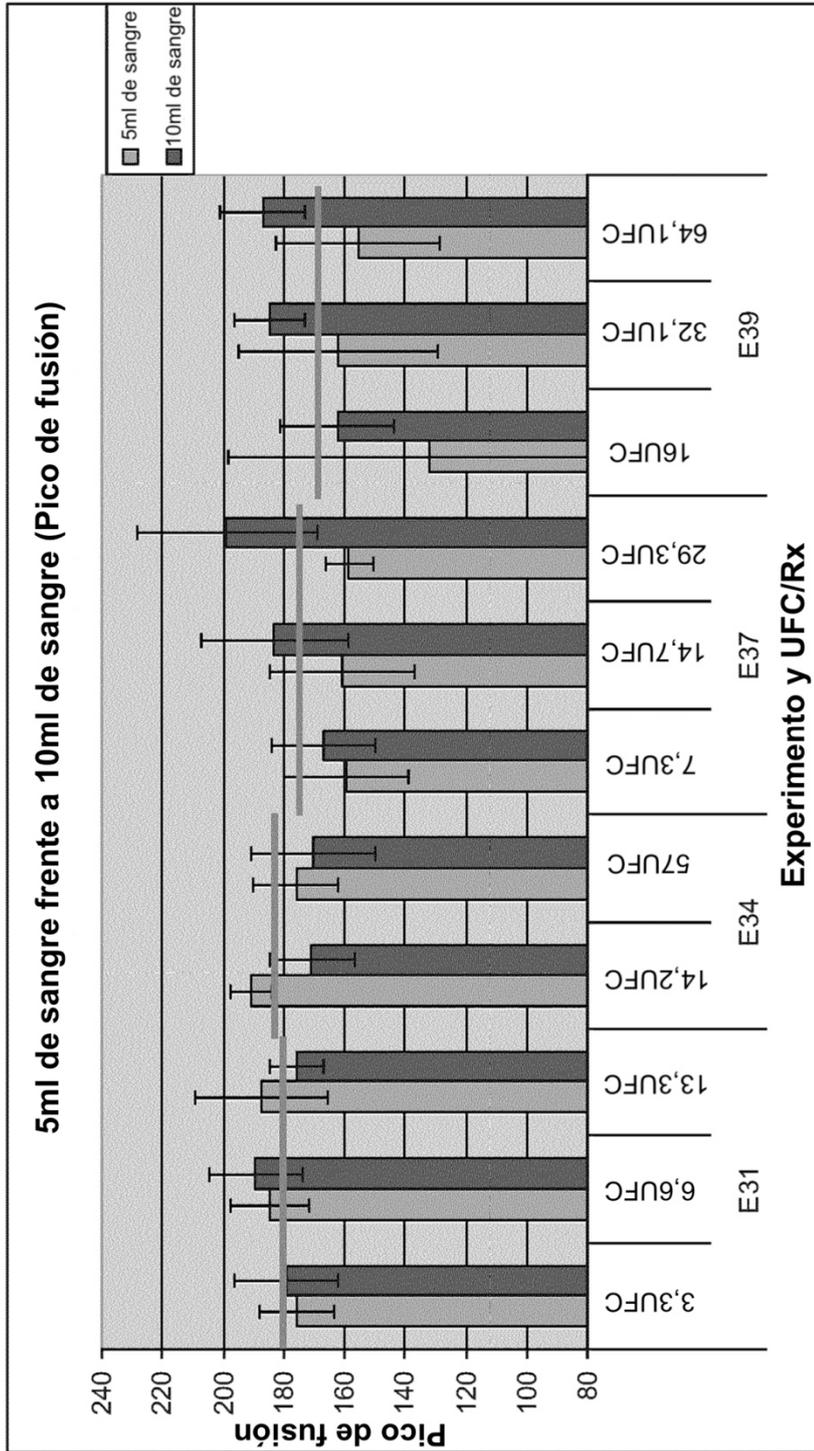


Figura 2C

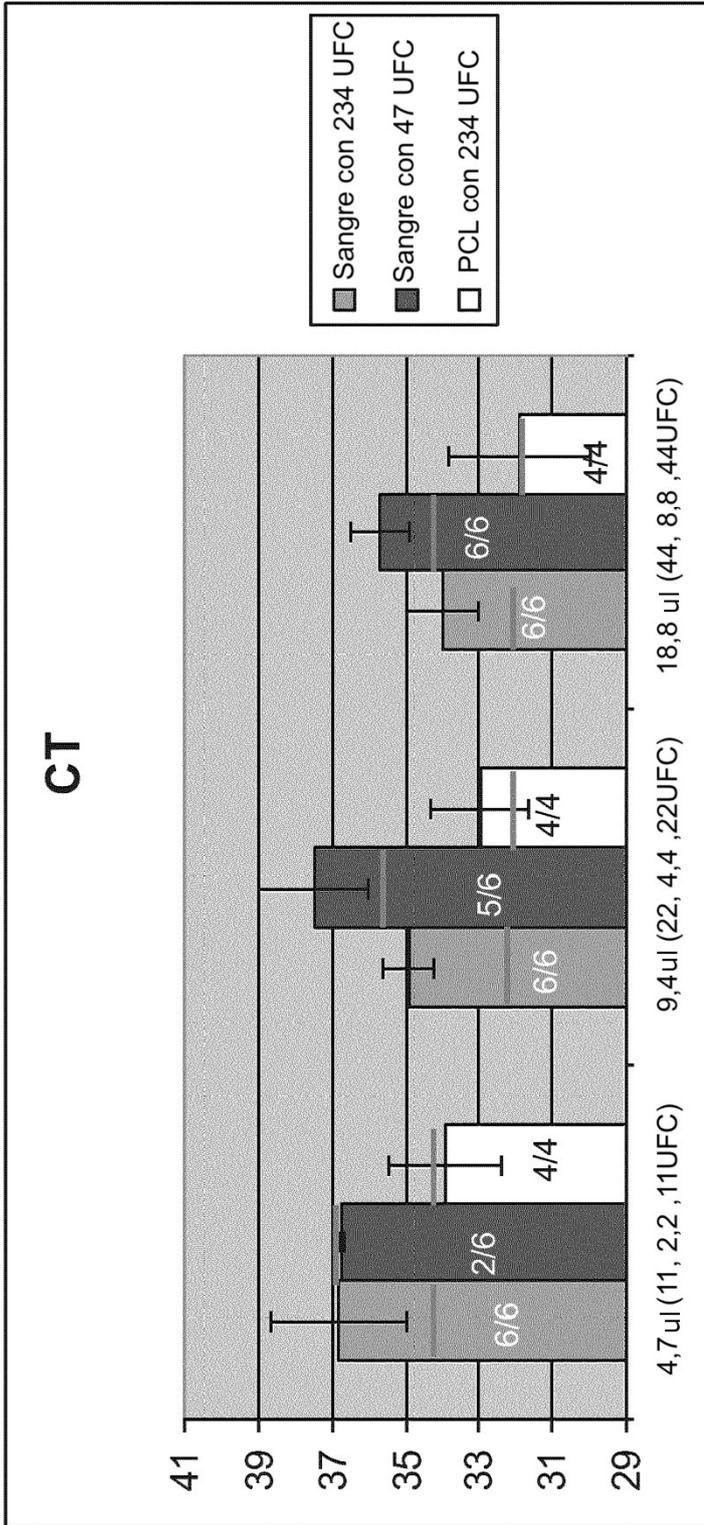


Figura 3A

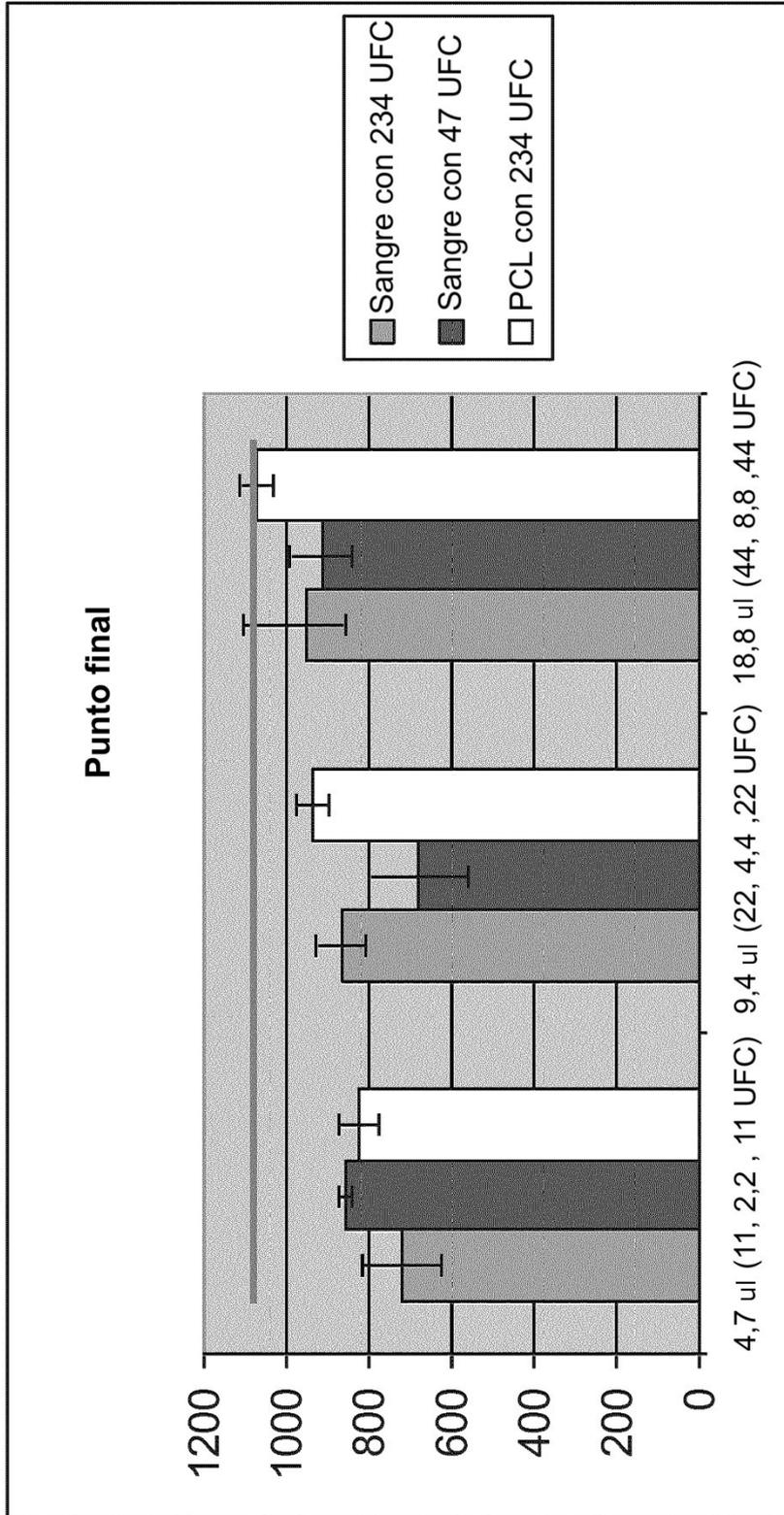


Figura 3B

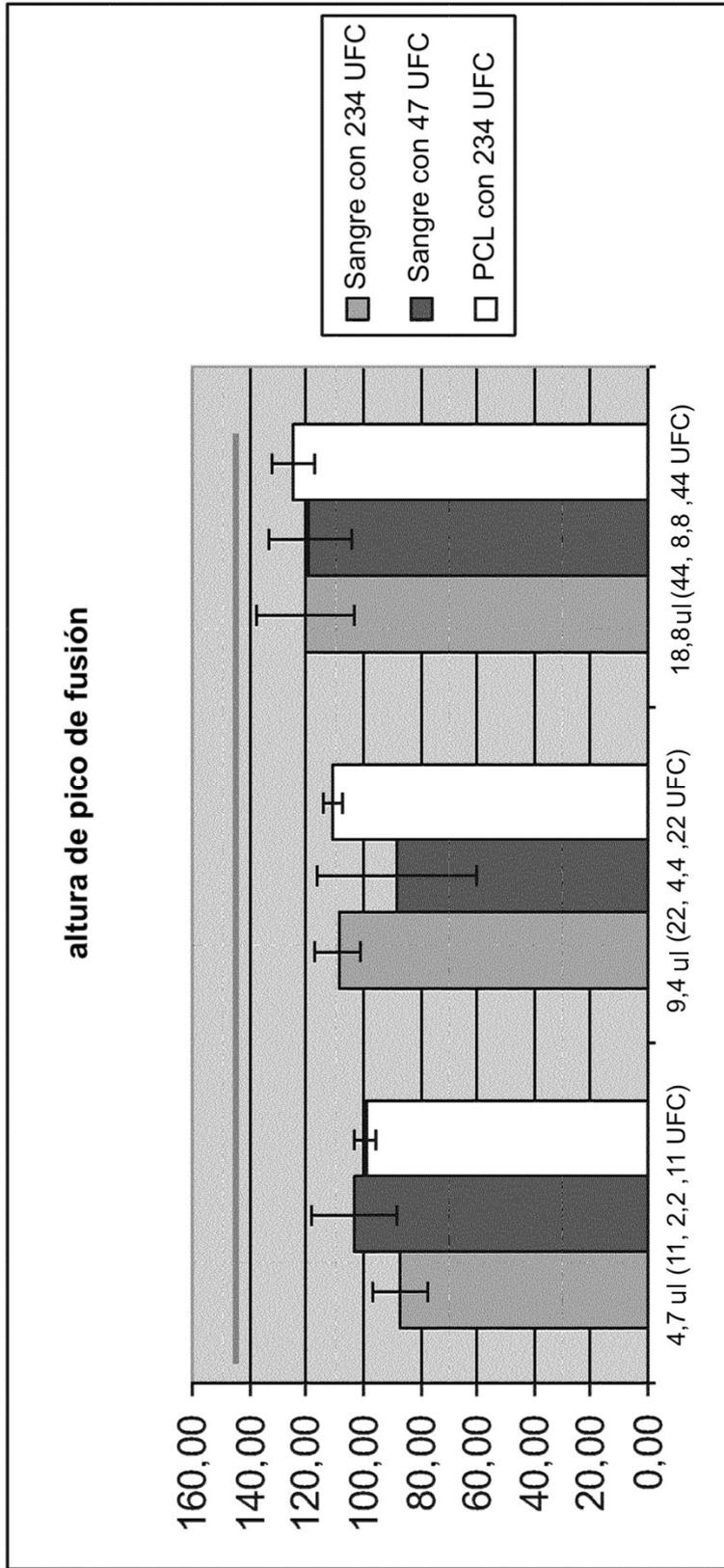


Figura 3C