

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 014**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2014 PCT/FR2014/050145**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2014 E 14704612 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2948548**

54 Título: **Procedimiento de aislamiento específico de ácidos nucleicos de interés**

30 Prioridad:

25.01.2013 FR 1350650

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

02.04.2020

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

TARENDEAU, FRANCK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 752 014 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

Procedimiento de aislamiento específico de ácidos nucleicos de interés

- 5 La presente divulgación se refiere a un procedimiento de aislamiento selectivo de microorganismos de interés y/o de ácidos nucleicos de interés dentro de una muestra biológica líquida que contiene o que es susceptible de contener, especialmente, un gran número de células no diana y/o un gran número de ácidos nucleicos de células no diana. Se refiere también a su utilización, unos ensayos de diagnóstico basados en un procedimiento de aislamiento de microorganismos de interés o sobre un procedimiento de aislamiento de los ácidos nucleicos de microorganismos de interés y de kits para permitir el aislamiento de microorganismos de interés y/o unos ácidos nucleicos de microorganismos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente, unos microorganismos de interés, unas células no diana y, eventualmente, unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana.
- 10
- 15 El estado de la técnica está constituido por un cierto número de publicaciones científicas y de patentes. Así, en 1992, Baker y sus colaboradores describieron la utilización de un reactivo denominado saponina para lisar de manera diferencial células humanas y aislar el patógeno plasmodio de la sangre total. Han demostrado que la saponina con una concentración final baja, del orden del 0,015%, puede lisar células humanas en 20 µl de sangre total tamponada con citrato y proporcionar bastante lisado limpio para realizar una detección PCR.
- 20 La solicitud de patente EP-A-0.745.849 ha reconsiderado este enfoque diferencial de utilización de la saponina para unos volúmenes de sangre total más amplios (5 ml) con una solución final concentrada en saponina del orden del 0,020-0,125%.
- 25 Otra solicitud de patente EP-A-2.185.681 propone un método de preparación de las soluciones de saponina, utilizando una solución de saponina más concentrada, es decir con una concentración final comprendida entre el 2 y el 10% para un volumen de sangre total de tamaño medio, es decir 5 ml. Esta invención propone utilizar unos tampones hipotónicos o fisiológicos para tales soluciones de saponina.
- 30 Sin embargo, en la actualidad, no hay disponible ninguna solución rápida para aislar e identificar una cantidad muy pequeña de células patógenas dentro de muestras biológicas voluminosas. Por ejemplo, para la septicemia, la necesidad es poder identificar de 1 a 10 unidades que forman colonias (CFU, Colony-Forming Unit) de patógenos en 10 ml de sangre total en un plazo de menos de 6 horas, es decir en los casos más difíciles 1 fg de ácido nucleico de patógeno diana para más de 800 µg de ácidos nucleicos no diana (humano).
- 35 Los problemas encontrados en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas son, por lo tanto:
- 1) la complejidad de la muestra matricial que incluye en general muy pocas células de patógenos, por un lado, y un número muy alto de células humanas, y otras células o partículas, por otro lado, que deben eliminarse para no inmiscuirse en el aislamiento y la identificación de los patógenos, y
- 40 2) las limitaciones físicas para aislar un muy pequeño número de patógenos a partir de un gran volumen de muestra.
- En resumen, el desafío es eliminar el máximo de elementos (células y/o partículas) no diana conservando el máximo de dianas patógenas que estaban inicialmente poco presentes a fin de incrementar artificialmente su concentración y facilitar su detección.
- 45 La invención descrita aquí es un método que puede aislar e identificar un pequeño número de patógenos a partir de grandes volúmenes de muestras biológicas (por ejemplo del orden de 10 ml) en un plazo relativamente corto. Estos patógenos son, de manera no limitativa, bacterias, virus y hongos. La invención permite identificar cantidades tan bajas como 3 CFU en 10 ml de sangre total (es decir 0,3 CFU/ml), con un límite de detección jamás descrito en la bibliografía. Su novedad se basa en:
- 50 1. Un límite de detección atractiva jamás alcanzado anteriormente, del orden de 0,3 CFU/ml, con respecto a la necesidad clínica, que es de 0,1 a 1 CFU/ml.
- 55 2. Una capacidad para utilizar diferentes sangres totales tamponadas con EDTA o citrato, pero también con heparina. La heparina es un reactivo muy utilizado en el hospital, pero frecuentemente excluido en los enfoques de biología molecular debido a su capacidad para impedir la amplificación de ácidos nucleicos y las reacciones a base de enzima(s). Esta invención puede gestionar la sangre tamponada con heparina, lo que no es el caso, en general, de los métodos moleculares descritos en la bibliografía.
- 60 3. Una capacidad para utilizar grandes volúmenes de sangre total de 10 ml o más.
- 65 4. La utilización de polietilenglicol (PEG) para mejorar la precipitación de los patógenos. La precipitación de ADN o de virus por el PEG está muy bien descrita en la bibliografía. Sin embargo, la utilización de PEG para precipitar unas

células bacterianas o de hongos, tales como las levaduras, está ausente en el estado de la técnica. Considerando que la saponina es un reactivo parecido al detergente, las células o partículas patógenas pueden flotar en el interior del tubo o tener dificultades para precipitar en el fondo de un tubo bajo el efecto de una centrifugación. Incluso si algunas muestras tratadas no lo necesitan, la adición de PEG garantiza una precipitación de las dianas, que es constante, sin riesgo de flotación. Además, esta adición de PEG mejora la adhesión de los residuos que contienen unos patógenos sobre el tubo plástico y la resistencia a los lavados de superficie.

5. Asociar la lisis diferencial con saponina con unos tratamientos a base de nucleasas fuertemente concentradas; en otras palabras, lisar unas células no-diana que liberarán sus ácidos nucleicos, que en una segunda fase se degradarán por un tratamiento con nucleasas. Esta lisis diferencial libera una gran cantidad de ácidos nucleicos humanos. Típicamente 880 µg de ADN humano pueden extraerse de 10 ml de sangre total. Estos ácidos nucleicos humanos son la fuente de importantes problemas cuando el objetivo es detectar un muy pequeño número de copias de ácidos nucleicos patógenos:

i) entran en competición durante la purificación de los ácidos nucleicos diana patógenos saturando los reactivos de captura de ácidos nucleicos debido a su exceso (como por ejemplo las membranas de sílice, las perlas de sílice magnéticas, las matrices de cromatografía o de afinidad, etc.).

ii) interfieren durante las amplificaciones de las moléculas patógenas. Eliminando el máximo de ácidos nucleicos humanos, se mejoran los límites de detección. Según estos puntos críticos, la invención utiliza una gran cantidad de nucleasas para eliminar un máximo de ácidos nucleicos humanos después de la lisis por la saponina. La combinación de saponina con un tratamiento de nucleasas fuertemente concentradas no se ha descrito nunca en la bibliografía.

6. Finalmente, se ha demostrado que la solución saponina tamponada, con un pH comprendido entre 6 y 9, permite evitar la precipitación de elementos indeseables de la sangre, particularmente unos glóbulos rojos. Los científicos han utilizado anteriormente unos tampones cerca de pH 7 para la solución saponina, pero sin correlacionarse nunca el impacto de este pH con la estabilidad de la muestra.

En resumen, la presente invención combina diferentes utilizaciones de productos químicos que permiten alcanzar un límite de detección de patógeno compatible con los valores de detección de una gama clínica (0,1 a 1 CFU/ml). La utilización combinada de saponina con PEG y al menos una nucleasa no se ha descrito nunca y permite una mejora técnica desconocida en la actualidad. La combinación de estos reactivos puede ser completa (saponina + PEG + nucleasa) o parcial (saponina + nucleasa o saponina + PEG solo o también PEG solo) para preparar la muestra para un análisis de identificación o una detección.

Para este fin, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de aislamiento selectivo de microorganismos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente:

* unos microorganismos de interés cuya membrana celular o la cápside no contiene colesterol, y

* unos elementos no diana, es decir:

- unas células no diana cuya membrana celular contiene colesterol, y

- eventualmente, unos virus de envoltura que contienen colesterol, y

- eventualmente unos micoplasmas que contienen colesterol, y

- eventualmente unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana,

comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

a) poner en contacto la muestra biológica líquida con una formulación de saponina, a fin de desestabilizar las membranas celulares que contienen colesterol o las envolturas virales que contienen colesterol o las membranas de microplasma que contienen colesterol.

b) realizar un choque osmótico de las células no diana a fin de lisarlas específicamente,

c) añadir una solución de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres (ADN y/o ARN) procedente de los elementos no diana lisados en solución en la muestra, que permiten obtener selectivamente los microorganismos de interés.

La presente divulgación cubre también un procedimiento de aislamiento selectivo de microorganismos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente:

* unos microorganismos de interés cuya membrana celular o la cápside no contiene colesterol, y

* unos elementos no diana, es decir:

5 - unas células no diana cuya membrana celular contiene colesterol, y

- eventualmente, unos virus de envoltura que contienen colesterol, y

- eventualmente unos micoplasmas que contienen colesterol, y

10 - eventualmente unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana,

comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

15 a) poner en contacto la muestra biológica líquida con una formulación de saponina, a fin de desestabilizar las membranas celulares que contienen colesterol y/o las envolturas virales que contienen colesterol y/o las membranas de micoplasma que contienen colesterol.

20 b) realizar un choque osmótico de las células no diana a fin de lisarlas específicamente,

c) añadir un agente de precipitación de los microorganismos de interés no lisados en solución en la muestra, que permiten obtener selectivamente los microorganismos de interés.

25 Según un tercer modo de realización, la divulgación cubre un procedimiento de aislamiento selectivo de microorganismos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente:

* unos microorganismos de interés cuya membrana celular o la cápside no contiene colesterol, y

30 * unos elementos no diana, es decir:

- unas células no diana cuya membrana celular contiene colesterol, y

- eventualmente, unos virus de envoltura que contienen colesterol, y

35 - eventualmente unos micoplasmas que contienen colesterol, y

- eventualmente unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana,

40 comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

a) poner en contacto la muestra biológica líquida con una formulación de saponina, a fin de desestabilizar las membranas celulares que contienen colesterol y/o las envolturas virales que contienen colesterol y/o las membranas de micoplasma que contienen colesterol.

45 b) realizar un choque osmótico de las células no diana a fin de lisarlas específicamente,

c) añadir un agente de precipitación de los microorganismos de interés no lisados en solución en la muestra, y

50 d) añadir una solución de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres (ADN y/o ARN) procedentes de los elementos no diana lisados en solución en la muestra, que permite obtener selectivamente los microorganismos de interés.

55 La etapa c) de este último procedimiento se puede realizar independientemente de la etapa a), después de las etapas a) y b) o después de la etapa d).

La presente divulgación se refiere también a un procedimiento de aislamiento selectivo de ácidos nucleicos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente:

60 * unos microorganismos de interés cuya membrana celular o la cápside no contiene colesterol, y

* unos elementos no diana, es decir:

- unas células no diana cuya membrana celular contiene colesterol, y

65 - eventualmente, unos virus de envoltura que contienen colesterol, y

- eventualmente unos micoplasmas que contienen colesterol, y
 - eventualmente unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana,
- 5
comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

10 a) poner en contacto la muestra biológica líquida con una formulación de saponina, a fin de desestabilizar las membranas celulares que contienen colesterol y/o las envolturas virales que contienen colesterol y/o las membranas de micoplasma.

b) realizar un choque osmótico de las células no diana a fin de lisarlas específicamente,

15 c) añadir una solución de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres (ADN y/o ARN) procedente de los elementos no diana lisados en solución en la muestra,

d) inactivar la enzima añadida en la etapa (c), y

20 e) hacer accesible los ácidos nucleicos de microorganismos de interés no degradados por la enzima de la etapa (c).

Según un quinto modo de realización, la presente divulgación cubre un procedimiento de aislamiento selectivo de ácidos nucleicos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente:

25 * unos microorganismos de interés cuya membrana celular o la cápside no contiene colesterol, y

* unos elementos no diana, es decir:

30 - unas células no diana cuya membrana celular contiene colesterol, y

- eventualmente, unos virus de envoltura que contienen colesterol, y

- eventualmente unos micoplasmas que contienen colesterol, y

35 - eventualmente unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana,

comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

40 a) poner en contacto la muestra biológica líquida con una formulación de saponina, a fin de desestabilizar las membranas celulares que contienen colesterol y/o las envolturas virales que contienen colesterol y/o las membranas de micoplasmas que contienen colesterol,

b) realizar un choque osmótico de las células no diana a fin de lisarlas específicamente,

45 c) añadir un agente de precipitación de los microorganismos de interés no lisados en solución en la muestra, y

d) hacer accesible los ácidos nucleicos de microorganismos de interés no accesibles por la acción de las etapas a) y b).

50 Según un sexto modo de realización, la presente divulgación cubre un procedimiento de aislamiento selectivo de ácidos nucleicos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente:

55 * unos microorganismos de interés cuya membrana celular o la cápside no contiene colesterol, y

* unos elementos no diana, es decir:

- unas células no diana cuya membrana celular contiene colesterol, y

60 - eventualmente, unos virus de envoltura que contienen colesterol, y

- eventualmente unos micoplasmas que contienen colesterol, y

- eventualmente unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana,

65 comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- 5 a) poner en contacto la muestra biológica líquida con una formulación de saponina, a fin de desestabilizar las membranas celulares que contienen colesterol y/o las envolturas virales que contienen colesterol y/o las membranas de micoplasmas que contienen colesterol,
- b) realizar un choque osmótico de las células no diana a fin de lisarlas específicamente,
- c) añadir un agente de precipitación de los microorganismos de interés no lisados en solución en la muestra, y
- 10 d) añadir una solución de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres (ADN y/o ARN) procedentes de los elementos no diana lisados en solución en la muestra,
- e) inactivar la enzima añadida en la etapa (d),
- 15 f) obtener los ácidos nucleicos de microorganismos de interés:
- * no degradados por la enzima de la etapa (d), y
- * no accesibles por la acción de las etapas a) y b).
- 20 La etapa c) de este último procedimiento se puede realizar independientemente de la etapa a), después de las etapas a) y b) o después de la etapa d).
- Según un séptimo aspecto, la presente divulgación se refiere también a un procedimiento de precipitación mejorado de los microorganismos de interés seleccionados entre las bacterias y los hongos (preferentemente las levaduras), que consiste en añadir al menos un agente de precipitación, en muestras biológicas líquidas, llegado el caso previamente tratadas por saponina.
- 25 La adición de agente(s) de precipitación permite mejorar el rendimiento de precipitación de los microorganismos contenidos en una muestra biológica líquida.
- 30 Sea cual sea el modo de realización, el procedimiento de aislamiento se caracteriza por que la saponina es de un volumen al menos igual o superior al volumen de la muestra a igual concentración.
- 35 La concentración final en saponina es superior al 0,02% e inferior o igual al 20%, preferentemente comprendida entre el 0,05% y el 20%, más preferiblemente entre el 0,5 y el 20% y aún más preferiblemente entre el 0,08 y el 4%.
- El choque osmótico de las células no diana a fin de lisar específicamente estas últimas es una propiedad inherente a la puesta en contacto de la muestra biológica líquida con la formulación de saponina tal como se describe en la etapa a). Esta formulación de saponina se utiliza en gran volumen, lo que tiene por efecto:
- 40 - fragilizar o desestabilizar las membranas celulares que contienen colesterol, a saber las membranas de las células no diana, y al mismo tiempo
- 45 - inducir una presión osmótica que llevará a la turgencia de las células no diana y a su lisis.
- En otras palabras, las etapas a) a b) pueden reescribirse en una sola etapa que consiste en poner en contacto la muestra biológica líquida con una formulación de saponina a fin de lisar específicamente las membranas celulares de las células no diana que contienen colesterol y las envolturas virales que contienen colesterol y las membranas de micoplasmas que contienen colesterol.
- 50 El procedimiento de aislamiento se caracteriza también por que la saponina está constituida por un triterpenoide.
- La saponina es específica de las membranas o envolturas que contienen colesterol.
- 55 En el ámbito del procedimiento de aislamiento de microorganismos de interés y del procedimiento de precipitación mejorado de microorganismos de interés según la invención, el agente de precipitación utilizado se selecciona entre el PEG, el glicógeno y los ácidos nucleicos (ADN/ARNt, etc.). Es también posible utilizarlos en mezcla.
- 60 El agente de precipitación preferiblemente utilizado es el PEG.
- En el ámbito del procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos de microorganismos de interés, el agente de precipitación puede estar constituido por el polietilenglicol (PEG).
- 65 Las concentraciones de agente de precipitación utilizadas en el ámbito de la invención están comprendidas entre el 0,1% y el 20%, preferentemente entre el 1% y el 20%.

5 Al final del procedimiento de aislamiento de los microorganismos de interés, sea cual sea su realización, es posible tratar el medio obtenido para aislar más los microorganismos de interés, permitiendo así su detección. Esto se lleva a cabo gracias a técnicas celulares clásicas, por ejemplo técnicas de citología (citometría de flujo u otras), técnica de inmunología (tecnología con los anticuerpos o los fagos para una detección por inmunoanálisis) o técnicas de cultivos celulares clásicos.

10 Así, es posible aplicar el medio obtenido para un cultivo clásico sobre un medio apropiado, preferentemente sobre un medio sólido (por ejemplo un medio agar nutritivo) en caja Petri durante al menos 24h, por ejemplo 48h para las levaduras, a una temperatura adecuada, por ejemplo 30°C para las levaduras, preferentemente 37°C, o cualquier medio apropiado para el crecimiento de los microorganismos de interés. También se puede utilizar cualquier técnica y protocolo conocido que permita el crecimiento de los microorganismos y después su individualización/aislamiento.

15 Según algunas variantes de realización del procedimiento de aislamiento, la enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres es una enzima que después se inactiva:

* químicamente por la adición de EDTA y/o de EGTA y/o de DTT y/o de β-mercaptoetanol y/o de DEPC, y/o de guanidina, y/o

20 * físicamente, por el aumento de la temperatura entre 40 y 100°C en presencia o no de detergentes, tales como el sulfato dodecilsódico (SDS).

25 En los casos en los que el procedimiento de aislamiento según la invención comprende sólo una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres (ADN y/o ARN) procedente de los elementos no diana lisados en solución en la muestra, esta enzima es una ADNasa.

30 Según algunas variantes de realización del procedimiento de aislamiento en el que se añade al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres, es decir durante la etapa (c) cuando el procedimiento utilizado no comprende etapa de adición de agente de precipitación o durante la etapa (d) cuando el procedimiento comprende una etapa de adición de agente de precipitación, la enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres es una enzima que puede inactivarse:

35 * químicamente por la adición de EDTA y/o de EGTA y/o de DTT y/o de β-mercaptoetanol y/o de DEPC, y/o de guanidina, y/o

* físicamente, por el aumento de la temperatura entre 40 y 100°C en presencia o no de detergentes, tales como el sulfato dodecilsódico (SDS).

40 En los procedimientos de aislamiento de microorganismos de interés y de aislamiento de ácidos nucleicos de microorganismos de interés según la invención que comprenden una etapa de adición de agente de precipitación y una etapa de adición de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres (ADN y/o ARN) procedentes de los elementos no diana lisados en solución en la muestra, estas dos etapas no tienen un orden definido y pueden intercambiarse en el desarrollo del procedimiento.

45 En el ámbito del procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos de microorganismos de interés según la invención que comprenden una etapa de inactivación de la enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres, el agente de precipitación puede añadirse después de esta etapa de inactivación.

50 La presente divulgación se refiere también a un procedimiento para el aislamiento de microorganismos de interés o para el aislamiento de ácidos nucleicos de microorganismos de interés o para la precipitación de microorganismos de interés, en una muestra biológica líquida, preferentemente de sangre, caracterizado por que, durante el procedimiento, el pH se mantiene en un intervalo de entre 5 y 10, preferiblemente entre 6 y 9, por la adición de una solución:

55 * básica si el valor del pH es inferior a 5, preferiblemente inferior a 6,

* ácida si el valor del pH es superior a 10, preferiblemente superior a 9, a fin de que el pH esté comprendido en el intervalo.

60 Según una variante de utilización, la invención utiliza una formulación de saponina que conduce a una concentración final superior al 0,02% e inferior o igual al 20%, preferiblemente superior al 0,05% e inferior o igual al 20% y/o un agente de precipitación (o agente precipitante) a una concentración del 0,1 al 20%, preferentemente del 0,1 al 4%, más preferiblemente aún del 0,5 al 4%, y/o una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres (ADN y/o ARN) que contienen entre 500 y 20000 unidades enzimáticas.

65

5 Según otro de sus aspectos, la presente divulgación cubre la utilización de una formulación de saponina y de una solución de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres (ADN y/o ARN) y eventualmente de al menos un agente de precipitación, preferentemente seleccionado entre el PEG, el glicógeno y los ácidos nucleicos (preferentemente ADN, ARNt), para el aislamiento de microorganismos de interés o de ácidos nucleicos de microorganismos de interés, en una muestra biológica líquida.

10 Según otro de sus aspectos, la presente invención cubre la utilización de PEG para la precipitación de microorganismos de interés, preferentemente de las bacterias y de los hongos (preferentemente las levaduras), en unas muestras biológicas líquidas, llegado el caso previamente tratadas por saponina.

15 La presente divulgación se refiere también a un ensayo de diagnóstico basado en un procedimiento de aislamiento de microorganismos de interés, tal como se ha descrito anteriormente, o sobre las utilidades para el aislamiento de los microorganismos de interés, tales como se han descrito anteriormente, o sobre un procedimiento de precipitación de microorganismos tal como se ha descrito anteriormente.

20 La presente divulgación se refiere también a un ensayo de diagnóstico basado en un procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos de microorganismos de interés, tal como se ha descrito anteriormente, o sobre las utilidades para el aislamiento de los ácidos nucleicos de microorganismos de interés, tales como se han descrito anteriormente.

El diagnóstico puede realizarse mediante unas técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia que utiliza, por ejemplo, unas técnicas clásicas de detección utilizadas en microbiología, unas técnicas de inmunoanálisis o unas técnicas de biología molecular clásicas como la PCR, la NASBA, etc.

25 La presente divulgación se refiere también a un kit de diagnóstico para permitir el aislamiento de microorganismos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente, unos microorganismos de interés, unas células no diana y, eventualmente, unos virus de envoltura, unos micoplasmas y/o unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana, comprendiendo el kit:

30 (a) un recipiente, y

(b) al menos una formulación de saponina, y

35 (c) al menos una solución de un agente de precipitación, tal como el polietilenglicol (PEG).

La presente divulgación se refiere finalmente a un kit de diagnóstico para permitir el aislamiento de los ácidos nucleicos de microorganismos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, en particular, unos microorganismos de interés, unas células no diana y, eventualmente, unos virus de envoltura, unos micoplasmas y/o unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana, comprendiendo el kit:

40 (a) un recipiente, y

45 (b) al menos una formulación de saponina, y

(c) al menos una solución de un agente de precipitación, tal como el polietilenglicol (PEG).

Los dos kits descritos anteriormente pueden comprender además (d) al menos una solución de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos.

50 El kit comprende además:

(c) o (d') al menos una solución ácida y/o al menos una solución básica, y/o

55 (d) EDTA y/o EGTA y/o DTT y/o β-mercaptoetanol y/o DEPC, y/o guanidina y/o

(e) al menos un detergente o un agente aniónico.

60 En la presente descripción, la o las enzimas que permiten lisar los ácidos nucleicos son unas enzimas conocidas y clásicamente utilizadas por el experto en la materia, tales como la DNasa I, La RNAsalf, etc. y la etapa que consiste en hacer accesible los ácidos nucleicos de los microorganismos de interés se efectúa de manera clásica y conocida por el experto en la materia, por ejemplo por una lisis mecánica y después una purificación de los ácidos nucleicos y una amplificación PCR o cualquier otra técnica conocida.

65 A continuación en esta divulgación, los términos utilizados reciben las definiciones siguientes:

- por "envoltura viral" se entiende la envoltura de los virus recubiertos que contiene colesterol, al contrario que la cápside de los virus de cápside, que no lo contienen. La envoltura viral es por lo tanto sensible a la saponina.
- 5 - por "desestabilizar las membranas celulares y/o envolturas virales y/o las membranas de los micoplasmas" se entienden los mecanismos fisicoquímicos que conducen a una pérdida de regulación de la osmolaridad a nivel membranario y/o de la envoltura viral y/o de la membrana y/o de la envoltura viral y/o de la membrana de un micoplasma, una perturbación del transporte membranario y la aparición potencial de poros a nivel de la membrana celular, micoplásmica o de la envoltura viral.
- 10 - los términos "microorganismos de interés" comprenden todos los microorganismos que no contienen colesterol accesible, los cuales son potencialmente patógenos, especialmente para el ser humano. Estos microorganismos agrupan unos virus (con la excepción de los virus de envoltura), unas bacterias, unos hongos (levaduras) pero también unos animales microscópicos.
- 15 - los "ácidos nucleicos de interés" corresponden a los ácidos nucleicos (ADN y ARN) contenidos en las células o partículas de los "microorganismos de interés" definidos anteriormente.
- por "células no diana" se debe entender cualquier célula de organismos vivos que no contienen "ácidos nucleicos de interés" como se han definido anteriormente.
- 20 - la abreviatura "EDTA" corresponde al ácido etilendiamina tetraacético (que corresponde en inglés a EthyleneDiamineTetraacetic Acid).
- la abreviatura "EGTA" corresponde al ácido tetraacético etilenglicol (es decir en inglés Ethylene Glucol Tetraacetic Acid).
- 25 - la abreviatura "DTT" corresponde al ditioneitol.
- la abreviatura "DEPC" corresponde a dietilpirocarbonato.
- 30 - la abreviatura CFU es por Colony-Forming Unit o unidad que forma colonias.
- mediante el término "detergentes" se entiende cualquier clase de moléculas que pueden inducir a una modificación fisicoquímicas de otras moléculas. Estos detergentes pueden ser de naturaleza química como el SDS, el tween-20, el tritonx-100, el brij97 o enzimáticos.
- 35 - por "muestra biológica líquida" se debe de entender una muestra líquida susceptible de contener los "microorganismos de interés" seleccionado entre el grupo siguiente: líquido amniótico, humor acuoso, bilis, sangre, secreción mamaria, lavado broncoalveolar, líquido cerebroespinal, quilo, quimo, heces, líquido intersticial, linfa, menstruaciones, mucosa, plasma, líquido pleural, pus, saliva, sebo, esperma, suero, esputo, sudor, fluido sinovial, lágrima, orina y humor vítreo.
- 40
- Por otro lado, debe ser claro que el procedimiento de aislamiento selectivo de ácidos nucleicos de interés tal como se ha descrito anteriormente así como su utilización permiten el aislamiento de los microorganismos de interés, en la medida en la que los ácidos nucleicos de interés corresponden a los ácidos nucleicos (ADN y/o ARN) contenidos en las células o partículas de los microorganismos de interés. En otras palabras, el aislamiento selectivo de los ácidos nucleicos de interés permite el aislamiento de los microorganismos de interés de cuyos ácidos nucleicos de interés provienen.
- 45
- 50 Los ejemplos siguientes se presentan para demostrar la eficacia del procedimiento según la invención y se dan a título ilustrativo y no a título limitativo.

Ejemplo 1: Detección de 5 y 10 CFU de *Pseudomonas aeruginosa* en 10 ml de sangre total tratados con una solución de saponina al 4%

55 Dentro de un tubo de plástico de 50 ml, se inocularon 20 ml de sangre total tratado por EDTA con 20, 10, 2 y 0 (control negativo) CFU de *Pseudomonas aeruginosa*. El número de CFU insertadas en la sangre se verificó mediante el esparcimiento sobre medios agares en caja de Petri. Los 20 ml de sangre inoculados se dividieron en dos y cada volumen de 10 ml se depositó en dos tubos plásticos de 50 ml para obtener unos duplicados. Cuarenta mililitros de una solución filtrada del 4% de saponina, 50 mM Tris-HCl a pH 8,0 y el 4% de PEG-8000 se añadieron a la sangre inoculada. Los tubos se agitaron por inversión dos veces, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó tres veces el residuo pegajoso con 15 ml del 4% PEG-8000 que evita el desprendimiento del residuo. Se añadió al residuo un volumen de 200 µl de Tris-HCl a 10 mM a un pH de 7,5.

60

65

Después, se pusieron en los tubos 10 µl de ADNsa I (500 µl/µl; Roche) y 2 µl ARNsa If (50 µl/µl; New England Biolabs). Los residuos se digirieron por las enzimas durante 10 minutos con dos agitaciones por vórtice después de 2 minutos y 4 minutos de incubación. Después de la digestión por las nucleasas, se añadieron a los tubos 10 µl de EDTA a 0,5 M y pH 8,0. Las muestras se transfirieron en microtubos de un volumen de 1,5 ml, que contenían 200 mg de perlas de vidrio de un diámetro de 1 mm y 50 mg de perlas de circonio de 0,1 mm de diámetro. Los microtubos se calentaron 10 minutos a 80°C. Se añadieron después 20 µl de Proteinasa K (Novagen) y 40 µl al 10% de SDS a los tubos. Se incubaron los microtubos 5 minutos a temperatura ambiente y se calentaron 5 minutos a 80°C.

La lisis mecánica de las células de *Pseudomonas* realizó agitando los tubos que contenían las perlas durante 20 minutos con la ayuda de un vórtice. EL ADN presente en el sobrenadante de lisis se purificó con la ayuda del kit Nucleospin Blood® de Macherey-Nagel. Se realizó una amplificación PCR cuantitativa con la utilización del eluato al completo, es decir 40 µl. Las muestras a 5 CFU de *Pseudomonas aeruginosa* se detectaron bien sobre un replicado con la ayuda de la invención, y observó una detección parcial de un replicado de dos para 1 CFU insertada, como se representa bien en la tabla I siguiente:

Tabla I: Evaluación del límite de detección para *Pseudomonas aeruginosa* con la ayuda del procedimiento según la invención

Muestra	Cq	Número de replicado detectado
10 CFU total	38,78	2/2
10 CFU total	37,74	
5 CFU total	42,18	2/2
5 CFU total	37,84	
1 CFU total	41,73	1/2
1 CFU total	N/A*	
Control negativo	N/A*	0/2
Control negativo	N/A*	

*: no se ha detectado ninguna señal de fluorescencia después de 50 ciclos de amplificación

Ejemplo 2: Detección de 28 y 140 CFU de *Candida albicans* en 10 ml de sangre total tratados con una solución de saponina al 4%

Dentro de un tubo de plástico de 50 ml, inocularon 20 ml de sangre total tratado por EDTA con 140, 28 y 0 (control negativo) CFU de *Candida albicans*. El número de CFU insertadas en la sangre verificó mediante el esparcimiento sobre medios agares en caja de Petri. Los 20 ml de sangre inoculados se dividieron en dos y cada volumen de 10 ml se depositó en dos tubos plásticos de 50 ml para obtener unos duplicados. Se añadieron a la sangre inoculada cuarenta mililitros de una solución filtrada del 4% de saponina, 50 mM Tris-HCl a pH 8,0 y 4% de PEG-8000. Los tubos se agitaron por inversión dos veces, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el residuo se lavó tres veces con 15 ml de 4% PEG-8000 que evita el desprendimiento del residuo. Se añadió al residuo un volumen de 200 µl de Tris-HCl a 10 mM a un pH de 7,5. Después, se colocaron en los tubos 10 µl de ADNasa I (500 µl/µl; Roche) y 2 µl de ARNasa If (50 µl/µl; New England Biolabs). Los residuos se digirieron por las enzimas durante 10 minutos con dos agitaciones por vórtice después de 2 minutos y 4 minutos de incubación. Después de la digestión por las nucleasas, se añadieron a los tubos 10 µl de EDTA a 0,5 M y pH 8,0, un volumen de 40 µl de SDS al 10% y 20 µl de Proteinasa K. Las muestras se transfirieron en microtubos de un volumen de 1,5 ml, que contenían 200 mg de perlas de vidrio de un diámetro de 1 mm y 50 mg de perlas de circonio de 0,1 mm de diámetro. Los microtubos se calentaron 60 minutos a 80°C. La lisis mecánica de las células de *Candida albicans* se realizó agitando las perlas durante 20 minutos con la ayuda de un vórtice. EL ADN presente en el sobrenadante de lisis se purificó con la ayuda del kit Nucleospin Blood® de Macherey-Nagel y se purificó una segunda vez con la ayuda del kit gDNA Clean-up XS® de Macherey-Nagel. Se realizó una amplificación PCR cuantitativa con la utilización del eluato al completo es decir 40 µl. Las muestras a 28 CFU de *Candida albicans* se detectaron sobre un replicado con la ayuda de la invención, como se representa bien en la tabla 2 siguiente:

Tabla 2: Detección para *Candida albicans* con la ayuda del procedimiento según la invención

Muestra	Cq	Número de replicado detectado
140 CFU total	37,44	2/2
140 CFU total	36,78	
28 CFU total	40,08	2/2
28 CFU total	38,42	
Control negativo	N/A*	0/1

*: no se ha detectado ninguna señal de fluorescencia después de 50 ciclos de amplificación

Ejemplo 3: Detección de 20000 viriones de adenovirus 5 humano en 10 ml de sangre total tratados con una solución del 4% de saponina

5 Dentro de un tubo de plástico de 50 ml, se inocularon 10 ml de sangre total tratados con EDTA con 20000 viriones de adenovirus 5 humano. Cuarenta mililitros de una solución filtrada de 4% de saponina, con 50 mM Tris-HCl a pH 8,0 y 4% de PEG-8000 se añadieron a la sangre inoculada. Los tubos se agitaron por inversión dos veces, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el residuo se lavó tres veces con 15 ml de 4% PEG-8000 que evita el desprendimiento del residuo. Se añadió al residuo un volumen de 200 µl de Tris-HCl a 10 mM y a un pH de 7,5. Después, se colocaron en los tubos 10 µl de ADNasa I (500 µµl; Roche) y 2 µl ARNasa If (50 µµL; New England Biolabs). Los residuos se digirieron por las enzimas durante 10 minutos con dos agitaciones por vórtice después de 2 minutos y 4 minutos de incubación. Después de la digestión por las nucleasas, se añadieron a los tubos 10 µl de EDTA 0,5 M, pH 8,0 y 40 µl de SDS 10%. Las muestras se transfirieron en microtubos de un volumen de 1,5 ml, que contenían 200 mg de perlas de vidrio de un diámetro de 1 mm y 50 mg de perlas de circonio de 0,1 mm de diámetro. Los microtubos se calentaron 10 minutos a 80°C. La lisis mecánica de los viriones se realizó agitando los tubos que contenían las perlas durante 20 minutos con la ayuda de un vórtice. El ADN presente en el sobrenadante de lisis se purificó con la ayuda del kit Nucleospin Blood® de Macherey-Nagel. Los ácidos nucleicos se eluyeron con 40 µl. Se realizó una amplificación PCR cuantitativa con la utilización de 10 µl de eluato. Los 20000 viriones se detectaron bien con la ayuda de la invención, véase la tabla 3 siguiente:

Tabla 3: Evaluación del límite de detección de adenovirus 5 humano con la ayuda de la invención

Muestra	Cq	Número de replicado detectado
20000 viriones total	34,7	1/1

Ejemplo 4: Eficacia de lisis de células humanas sanguíneas por diferentes concentraciones de saponina.

25 Dentro de un tubo de plástico de 50 ml, se inocularon 10 ml de sangre total tratado por EDTA con 24 y 0 (control negativo) CFU de *Pseudomonas aeruginosa*. El número de CFU insertadas en la sangre se verificó mediante el esparcimiento sobre medios agares en caja de Petri. Se añadieron a la sangre inoculada cuarenta mililitros de una solución filtrada de saponina, 50 mM Tris-HCl a pH 8,0 y un 4% de PEG-8000. Las concentraciones finales de saponina eran del 0,005%, el 0,02%, el 0,08% y el 0,4%. Cada concentración se analizó en duplicado. Los tubos se agitaron por inversión tres veces, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó tres veces el residuo pegajoso con 15 ml de 4% PEG-8000 que evita el desprendimiento del residuo. Se añadió al residuo un volumen de 400 µl de Tris-HCl a 10 mM a un pH de 7,5, MgCl₂ 2,5mM, CaCl₂ 0,5 mM, ADNasa I (Roche) 5000u, ARNasa If (New England Biolabs) 100u. Los residuos se incubaron a 32°C bajo agitación durante 90 minutos. Las muestras se transfirieron en unos microtubos que contenían 10 µl de EDTA a 0,5 M pH 8,0 y 400 µl de tampón B3 (Macherey-Nagel). Los microtubos se calentaron 10 minutos a 80°C y después se enfriaron 5 min en hielo. Se añadieron 5 µg de lisina a los tubos. Se incubaron los microtubos 10 minutos más en hielo y después se trataron mediante el kit Nucleospin Blood® de Macherey-Nagel según las condiciones del proveedor duplicando no obstante las cantidades de proteinasa K y de etanol para respetar las proporciones de reactivos. Se realizó una amplificación PCR cuantitativa con la utilización de 2 µl de eluato para la detección de los ADN humanos y 38 µl para los PCR que detectan el ADN de *Pseudomonas aeruginosa*.

45 La mayoría de los tubos fueron positivos para *Pseudomonas aeruginosa* (siendo los controles negativos, sangres no inoculadas, tratadas con el 0,4% de saponina muy negativos). El ejemplo muestra que es posible detectar *Pseudomonas aeruginosa* para unas concentraciones de saponina muy inferiores al 0,4%.

50 Las amplificaciones para las concentraciones finales de saponina iguales o superiores al 0,08% no consiguieron detectar ADN humano o bien unas cantidades extremadamente bajas (Tabla 4). Por el contrario, para las concentraciones finales de saponina iguales o inferiores al 0,02%, las cantidades de ADN humanos detectados son muy elevadas (Cq alrededor de 28). Esto demuestra que a una concentración final de saponina inferior o igual a un valor del 0,02%, los glóbulos blancos de la sangre no se lisan ya correctamente, mientras que se lisan muy bien con una concentración final del 0,08% o del 0,4% de saponina.

Tabla 4: Evaluación de la lisis de las células humanas sanguíneas

Muestra	Cq (ADN humano)	Números de tubos positivos para <i>P. aeruginosa</i>
Control negativo 0,4% saponina	No detectado*	0/2 (Controles)
Control negativo 0,4% saponina	No detectado*	
0,4% saponina	39,16	2/2
0,4% saponina	No detectado*	1/2
0,08% saponina	No detectado*	
0,08% saponina	No detectado*	

0,02% saponina	27,35	2/2
0,02% saponina	27,99	
0,005% saponina	28,63	1/2
0,005% saponina	29,27	

*: no se ha detectado ninguna señal de fluorescencia después de 50 ciclos de amplificación.

Ejemplo 5: Detección de 21 CFU de *Pseudomonas aeruginosa* en 10 ml de sangre total tratados con una solución del 0.4% de saponina.

5 Dentro de un tubo de plástico de 50 ml, se inocularon 10 ml de sangre total tratado por EDTA con 21 (5 tubos) y 0 (control negativo, 1 tubo) CFU de *Pseudomonas aeruginosa*. El número de CFU insertadas en la sangre se verificó mediante el esparcimiento sobre medios agares en caja de Petri. Se añadieron a la sangre inoculada cuarenta mililitros de una solución filtrada de 0,4% saponina, 50 mM Tris-HCl a pH 8,0 y 4% de PEG-8000. Los tubos se agitaron por inversión tres veces, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó tres veces el residuo pegajoso con 15 ml de un 4% PEG-8000 que evita el desprendimiento del residuo. Se añadió al residuo un volumen de 800 µl de Tris-HCl a 10 mM a un pH de 7,5, MgCl₂ 2,5mM, CaCl₂ 0,5 mM, ADNasa I (Roche) 5000u, ARNasa If (New England Biolabs) 100u. Los residuos se incubaron a 32°C bajo agitación durante 90 minutos. Se añadieron 10 µl de EDTA a 0,5 M pH 8,0 y 400 µl de tampón B3 (Macherey-Nagel) y después los tubos se calentaron 10 minutos a 80°C y después se enfriaron 5 min en hielo. Se añadieron 5 µg de lisina a los tubos. Los tubos se incubaron 10 minutos más en hielo y después se trataron mediante el kit Nucleospin Blood® de Macherey-Nagel según las condiciones del proveedor cuadruplicando no obstante las cantidades de proteinasa K y de etanol para respetar las proporciones de reactivos. Se realizó una amplificación PCR cuantitativa con la utilización de 2 µl de eluato para la detección de los ADN humanos y 38 µl para las PCR que detectan el ADN de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 5: PCR cuantitativa de detección del ADN de *P. aeruginosa*

Muestra	Cq (ADN <i>P. aeru.</i>)	Números de tubos positivos para <i>P. aeruginosa</i>
Control negativo	No detectado*	0/1
21 CFU total	36,60	5/5
21 CFU total	36,17	
21 CFU total	37,21	
21 CFU total	38,81	
21 CFU total	38,36	

* no se ha detectado ninguna señal de fluorescencia después de 50 ciclos de amplificación.

Ejemplo 6: Detección por crecimiento sobre medio sólido de 117 CFU de *Candida albicans* a partir de 10 ml de sangre total tratados con un 4% de saponina

25 En el interior de un tubo de plástico de 50 ml, se inocularon 10 ml de sangre total tratado por EDTA con 117 CFU de *Candida albicans*. El número de CFU insertado en la sangre se verificó mediante el esparcimiento sobre medios agares en caja de Petri. Se añadieron a la sangre coagulada cuarenta mililitros de una solución filtrada de 4% de saponina, 50 mM Tris-HCl a pH 8,0 y 4% de PEG-8000. Los tubos se agitaron por inversión dos veces, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos. Los residuos obtenidos se resuspendieron con 212 µl de triptona sal (AES) o 212 µl de mezcla de nucleasas (Tris 10 mM pH 7,5; ADNasa I (Roche) 5000 u; ARNasa If (New England Biolabs) 100u), se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y después se esparcieron sobre un medio en caja Petri SDC (bioMérieux). El número de colonias se recontó después de una incubación a 30°C durante 48 horas.

La tabla 6 muestra que de promedio se encontró un 66% de CFU después del tratamiento con la saponina con o sin tratamiento con nucleasas.

Tabla 6: Enumeración sobre caja de colonias de *Candida albicans* después del tratamiento al 4% de saponina

Muestra	Resuspensión	Número de colonias	Media
117 CFU total	Triptona-sal	84	78,5 (67% de 117)
117 CFU total	Triptona-sal	73	
117 CFU total	Mezcla nucleasas	87	76 (65% de 117)
117 CFU total	Mezcla nucleasas	65	

*: no se ha detectado ninguna señal de fluorescencia después de 50 ciclos de amplificación.

Ejemplo 7: efecto facilitador del PEG sobre la precipitación por centrifugación de *Pseudomonas aeruginosa* presente en sangre

5 Se repartieron 200 µl de sangre total tratado por EDTA en el interior de tubo plástico de 1,5 ml. Se añadieron a los tubos 1 ml de MgCl₂ 10 mM o 1ml de MgCl₂ suplementado con un 4% de PEG final. Después, estos tubos se inocularon con 129 CFU de *Pseudomonas aeruginosa*. Los tubos se vortizaron 5 segundos y después se centrifugaron 10 minutos a 5000 g. Los residuos se resuspendieron después con 100 µl de Triptona-sal y después se esparcieron sobre un medio sólido en caja Petri TSA (bioMérieux). Las cajas se incubaron 24h a 37°C antes de la enumeración.

10

La adición de PEG contribuyó a una mejora del 23,5% del rendimiento de precipitación (Tabla 7).

Tabla 7: Enumeración sobre caja de colonias de *Pseudomonas aeruginosa* después de la centrifugación con o sin presencia de PEG

15

Muestra	Solución de precipitación	Número de colonias	Media
129 CFU total	MgCl ₂	66	70 (54% de 129)
129 CFU total	MgCl ₂	74	
129 CFU total	MgCl ₂ +PEG	100	100 (77,5% de 129)
129 CFU total	MgCl ₂ +PEG	100	

*: no se ha detectado ninguna señal de fluorescencia después de 50 ciclos de amplificación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de aislamiento selectivo de microorganismos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente:

- 5 * unos microorganismos de interés cuya membrana celular o la cápside no contiene colesterol, y
- * unos elementos no diana, es decir:
- 10 - unas células no diana cuya membrana celular contiene colesterol, y
- eventualmente, unos virus de envoltura que contienen colesterol, y
- 15 - eventualmente unos micoplasmas que contienen colesterol, y
- eventualmente unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana,

comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- 20 a) poner en contacto la muestra biológica líquida con una formulación de saponina, a fin de desestabilizar las membranas celulares que contienen colesterol o las envolturas virales que contienen colesterol o las membranas de microplasma que contienen colesterol,
- 25 b) realizar un choque osmótico de las células no diana a fin de lisarlas específicamente,
- c) añadir una solución de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres, ADN y/o ARN, procedente de los elementos no diana lisados en solución en la muestra, que permiten obtener selectivamente los microorganismos de interés,
- 30 d) añadir un agente de precipitación de los microorganismos de interés no lisados en solución en la muestra, permitiendo dicho agente la adhesión del residuo que contiene estos microorganismos de interés y seleccionándose entre el polietilenglicol (PEG), el glicógeno, los ácidos nucleicos o una mezcla de estos agentes de precipitación.

35 2. Procedimiento de aislamiento selectivo de microorganismos de interés dentro de una muestra biológica líquida, según la reivindicación 1, en el que la etapa que consiste en añadir un agente de precipitación de los microorganismos de interés no lisados en solución en la muestra se realiza en la etapa a), después de las etapas a) y b) o después de la etapa c).

40 3. Procedimiento de aislamiento selectivo de ácidos nucleicos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente:

- * unos microorganismos de interés cuya membrana celular o la cápside no contiene colesterol, y
- 45 * unos elementos no diana, es decir:
- unas células no diana cuya membrana celular contiene colesterol, y
- eventualmente, unos virus de envoltura que contienen colesterol, y
- 50 - eventualmente unos micoplasmas que contienen colesterol, y
- eventualmente unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana,

comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- 55 a) poner en contacto la muestra biológica líquida con una formulación de saponina, a fin de desestabilizar las membranas celulares que contienen colesterol o las envolturas virales que contienen colesterol o las membranas de microplasma que contienen colesterol,
- 60 b) realizar un choque osmótico de las células no diana a fin de lisarlas específicamente,
- c) añadir una solución de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres, ADN y/o ARN, procedente de los elementos no diana lisados en solución en la muestra,
- 65 d) inactivar la enzima añadida en la etapa (c), y

- e) añadir un agente de precipitación de los microorganismos de interés no lisados en solución en la muestra, permitiendo dicho agente la adhesión del residuo que contiene estos microorganismos de interés y seleccionándose entre el PEG, el glicógeno, los ácidos nucleicos o una mezcla de estos agentes de precipitación,
- 5 y hacer accesible los ácidos nucleicos de microorganismos de interés no degradados por la enzima de la etapa (c).
4. Procedimiento de aislamiento selectivo de ácidos nucleicos de interés dentro de una muestra biológica líquida, según la reivindicación 3, en el que la etapa que consiste en añadir un agente de precipitación de los microorganismos de interés no lisados en solución en la muestra se realiza en la etapa a), después de las etapas a) y b) o después de la etapa c) o después de la etapa d).
- 10
5. Procedimiento de aislamiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la saponina está en un volumen al menos igual o superior al volumen de la muestra a igual concentración.
- 15
6. Procedimiento de aislamiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la concentración final en saponina es superior al 0,02% e inferior o igual al 20%.
7. Procedimiento de aislamiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 a 6, caracterizado por que el agente de precipitación está constituido por el PEG.
- 20
8. Procedimiento de aislamiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la saponina está constituida por un triterpenoide.
9. Procedimiento de aislamiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres se inactiva después:
- 25
- químicamente por adición de EDTA y/o de EGTA y/o de DTT y/o de β-mercaptoetanol y/o de DEPC y/o de guanidina y/o
 - físicamente por aumento de la temperatura entre 40 y 100°C en presencia o no de detergentes, tales como el dodecilsulfato de sodio (SDS).
- 30
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que durante el procedimiento, el pH se mantiene en un intervalo entre 5 y 10, preferiblemente entre 6 y 9, mediante la adición de una solución:
- 35
- básica si el valor del pH es inferior a 5, preferiblemente inferior a 6,
 - ácida si el valor del pH es superior a 10, preferiblemente superior a 9,
- 40
- a fin de que el pH esté comprendido en el intervalo.
11. Utilización de una formulación de saponina, de una solución de al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres, ADN y/o ARN, y de al menos un agente de precipitación para el aislamiento de microorganismos de interés o de ácidos nucleicos de microorganismos de interés, en una muestra biológica líquida, permitiendo dicho agente la adhesión del residuo que contiene estos microorganismos de interés y seleccionándose entre el PEG, el glicógeno, los ácidos nucleicos o una mezclas de estos agentes de precipitación.
- 45
12. Utilización según la reivindicación 11, caracterizada por que utiliza una formulación de saponina que conduce a una concentración final superior al 0,02% e inferior o igual al 20%, un agente de precipitación a una concentración del 0,1 al 20%, y una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos libres (ADN y/o ARN) que contienen entre 500 y 20000 unidades enzimáticas.
- 50
13. Ensayo de diagnóstico basado en una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12.
- 55
14. Kit de diagnóstico para permitir el aislamiento de los microorganismos de interés y/o el aislamiento de los ácidos nucleicos de microorganismos de interés dentro de una muestra biológica líquida que comprende o que es susceptible de comprender, especialmente, unos microorganismos de interés, unas células no diana y, eventualmente, unos virus de envoltura, unos micoplasmas y/o unos restos de microorganismos de interés y/o de células no diana, comprendiendo el kit:
- 60
- (a) un recipiente, y
 - (b) al menos una formulación de saponina, y
- 65

(c) al menos una solución de un agente de precipitación, permitiendo dicho agente la adhesión del residuo que contiene estos microorganismos de interés y seleccionándose entre el PEG, el glicógeno, los ácidos nucleicos o una mezcla de estos agentes de precipitación,

5 (d) al menos una enzima apta para lisar los ácidos nucleicos.

15. Kit, según la reivindicación 14, caracterizado por que el kit comprende además:

10 d') al menos una solución ácida y/o al menos una solución básica, y/o

e) EDTA y/o EGTA y/o DTT y/o β -mercaptoetanol y/o DEPC y/o guanidina y/o

f) al menos un detergente o un agente aniónico.