



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 350**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04817984 .0**

96 Fecha de presentación : **07.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1695086**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

54 Título: **Procedimientos para detectar patógenos bacterianos.**

30 Prioridad: **09.12.2003 US 527925 P**  
**20.05.2004 US 572997 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.05.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.05.2009**

73 Titular/es: **bioMerieux, Inc.**  
**100 Rodolphe Street**  
**Durham, North Carolina 27712, US**

72 Inventor/es: **Walsh, John, D. y**  
**Hyman, Jones, M.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 320 350 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

Procedimientos para detectar patógenos bacterianos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para la identificación de patógenos bacterianos incluyendo *Staphylococcus*. Más concretamente, la presente invención se refiere a la identificación de *Staphylococcus aureus* en muestras.

10 **Antecedentes de la invención**

El género *Staphylococcus* incluye al menos 20 especies diferentes. (Para una revisión, véase Novick, R.P., The *Staphylococcus* as a Molecular Genetic System, Capítulo 1, págs. 1-37 en MOLECULAR BIOLOGY OF THE STAPHYLOCOCCI, R. Novick, Ed., VCH Publishers, Nueva York (1990)). Las especies se diferencian entre sí en un 80% o más, por cinética de hibridación, mientras que las cepas dentro de las especies son idénticas en al menos un 90% por la misma técnica.

La especie *Staphylococcus aureus* es un coco gram positivo, aerobio facultativo formador de agregados considerado entre las especies más virulentas del género.

*Staphylococcus aureus* es un patógeno ubicuo. (Véase, por ejemplo, Mims y col., MEDICAL MICROBIOLOGY, Mosby-Year Book Europe Limited, Londres, Reino Unido (1993)). Es un agente etiológico de una variedad de dolencias, de gravedad variable entre leve y fatal. Unas pocas de entre las dolencias más comunes causadas por infecciones de *S. aureus* son quemaduras, celulitis, infecciones del párpado, envenenamiento de alimentos, infecciones en las articulaciones, conjuntivitis neonatal, osteomielitis, infecciones de la piel, infecciones de heridas quirúrgicas, dermatitis exfoliativa, y síndrome de shock tóxico. *Staphylococcus aureus* también produce enfermedades más graves como neumonía, meningitis y bacteremia.

Cuando se introduce en un alimento, *Staphylococcus aureus* puede producir una o más enterotoxinas estafilocócicas. Si se ingieren, las enterotoxinas estafilocócicas termoestables pueden producir síntomas de envenenamiento por alimentos y una gama de otras enfermedades.

*Staphylococcus aureus* posee una pared celular protectora que comprende una capa de peptidoglicano reticulado. La pared celular es resistente a la fagocitosis, lo que se cree es debido, en parte, a la producción de Proteína A sobre la superficie celular. *Staphylococcus aureus* también produce toxina hemolítica, que puede dañar los glóbulos rojos y las células inmunes.

De acuerdo con lo mencionado, es claramente evidente que es importante que los patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus* se puedan identificar en muestras, y que estos patógenos sean identificados tan rápidamente como sea posible, de forma que los pacientes puedan ser tratados con rapidez. A dicho fin, se han desvelado diferentes procedimientos para detectar *Staphylococcus aureus*. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5.496.706 desvela un procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra. El procedimiento usa anticuerpos anti-MRSA-230 para detectar *Staphylococcus aureus* por medios de aglutinación visible. Este procedimiento, sin embargo, es bastante caro.

Muchos laboratorios realizan un test de la coagulasa en porta como procedimiento rápido y barato para la presunta identificación de *S. aureus*. Este test se basa en la observación de la aglutinación de una suspensión densa de células de *S. aureus* en presencia de una gota de plasma sobre un porta. La aglutinación va mediada por el enlace del fibrinógeno con un receptor específico en la superficie de la bacteria, denominado factor de aglutinación. Sin embargo, el test de la coagulasa en porta tiene numerosos inconvenientes. Por ejemplo, de 10 a 15% de aislados de *S. aureus* producen resultados negativos falsos, obligando a la confirmación de todos los negativos en un test de la coagulasa en tubo. Un test de la coagulasa en tubo es otro procedimiento de uso habitual para identificar *S. aureus*. Este procedimiento, sin embargo, requiere un periodo de incubación de 4 a 24 horas.

Además, los procedimientos de la PCR de ciclo rápido en tiempo real pueden proporcionar resultados en treinta (30) minutos y los procedimientos de hibridación *in situ* con sonda como FISH pueden proporcionar resultados en noventa (90) minutos. Sin embargo, estos procedimientos son caros, y/o requieren mucho trabajo.

Además, el ensayo directo de botellas de cultivo celular positivo usando tests en látex no se ha recomendado debido a la escasa sensibilidad y especificidad del ensayo. Véase Spears, D.J. y col., J. Clin. Microbiol. 36:1032-1034 (1998) y Slidex Staph Plus, 09760 C-GB, bioMerieux, Inc. (2000). Así, hay una necesidad en la técnica de un medio rápido, preciso y barato para detectar e identificar *Staphylococcus aureus*.

También se puede hacer referencia a lo siguiente: documento US-B-6.340.571, que se refiere a anticuerpos específicos para *Staphylococcus aureus* y uso de los mismos; documento EP-A-0 323 331, que se refiere a un reactivo para la detección de *Staphylococcus aureus* por aglutinación; y van Griethuysen, A., y col., Journal of Clinical Microbiology, 39, 2001, 86-89, que se titula "International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*".

### Resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra que es rápido, preciso y menos caro que los procedimientos de la técnica anterior. El procedimiento comprende las etapas de:

(a) mezclar una muestra que comprende un medio y microorganismos con una primera solución en un recipiente, de los microorganismos sospechosos de comprender *Staphylococcus aureus*;

(b) separar los microorganismos del medio y del volumen de la primera solución y eliminar el medio y el volumen de la primera disolución del recipiente;

(c) añadir una segunda solución al recipiente para volver a suspender los microorganismos; y

(d) detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de la etapa (c) usando un test de aglutinación.

La presente invención también proporciona otro procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra. Este procedimiento comprende las etapas de:

(a) preparar una muestra que comprende un medio, microorganismos y plasma, suero, sangre o un componente de la sangre, de los microorganismos sospechosos de comprender *Staphylococcus aureus*;

(b) mezclar la muestra con una primera disolución en un recipiente;

(c) separar los microorganismos del medio, el volumen de la primera disolución y el volumen de plasma, suero, sangre o componente de la sangre y eliminar el medio, el volumen de la primera disolución y el volumen de plasma, suero, sangre o componente de la sangre del recipiente;

(d) añadir una segunda disolución al recipiente para volver a suspender los microorganismos; y

(e) detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la disolución resultante de la etapa (d) usando un test de aglutinación.

Los procedimientos anteriormente descritos proporcionan un resultado definitivo en quince (15) minutos, permitiendo que se pueda notificar al médico a cargo del paciente la identificación de este importante patógeno.

Además, se pueden usar modificaciones de estos procedimientos para evaluar la presencia de otras bacterias patógenas que pueden expresar factores de virulencia idéntica o similar a los de *S. aureus*.

### Descripción detallada de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra caracterizado porque comprende:

(a) mezclar una muestra que comprende un medio y microorganismos con una primera disolución que comprende un reactivo alcalino, un detergente y un agente quelante en un recipiente, de los microorganismos sospechosos de comprender *Staphylococcus aureus*;

(b) separar los microorganismos del medio y del volumen de la primera disolución y eliminar el medio y el volumen de la primera disolución del recipiente;

(c) añadir una segunda disolución que comprende una disolución ácida y/o un tampón, un detergente y una sal al recipiente para volver a suspender los microorganismos; y

(d) detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de la etapa (c) usando un test de aglutinación.

Las muestras que se pueden usar en este procedimiento de la presente invención se pueden obtener de cualquier fuente, incluyendo, pero sin limitación a, sangre, productos sanguíneos, tejidos, ascites, medios de cultivo, fluidos corporales, piel, pus, especímenes uro-genitales, heces, alimentos, bebidas, productos cosméticos, productos farmacéuticos, productos para el cuidado de la salud, superficies como suelos y mesas, y partículas aéreas como polen y polvo. La muestra será una muestra que sea sospechosa de tener microorganismos, en particular, *Staphylococcus aureus*. La muestra puede haber sido ya ensayada para la presencia de microorganismos y haber dado un ensayo positivo para los microorganismos. La muestra puede requerir la adición de un medio antes de la etapa (a). La cantidad de medio a añadir, si se necesita, sería dependiente del número estimado de microorganismos en la muestra y puede ser establecida fácilmente por una persona experta en la técnica.

## ES 2 320 350 T3

El plasma, suero, sangre o componente de la sangre se mezcla preferiblemente con la muestra y la primera disolución en la etapa (a). Si el plasma, suero, sangre o componente de la sangre se mezcla con la muestra y la primera disolución, el volumen de plasma, suero, sangre o componente de la sangre se separa junto con el medio y el volumen de la primera disolución de los microorganismos y se eliminan del recipiente durante la etapa (b). La muestra, por tanto, se puede obtener de una fuente tal como sangre, productos sanguíneos, tejido, fluidos corporales, piel, pus, etc., y por tanto ya incluye plasma, suero, sangre o un componente de la sangre. En estos casos, el volumen de plasma, suero, sangre o componente de la sangre se separa junto con el medio y el volumen de la primera disolución de los microorganismos y se elimina del recipiente durante la etapa (b).

La etapa (a) proporciona que la muestra y la primera disolución se mezclen en un recipiente y esto puede llevarse a cabo con una vortización breve del recipiente. Preferiblemente, el recipiente es un tubo cónico.

La cantidad de muestra que se puede mezclar con la primera disolución en la etapa (a) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml, preferiblemente, la cantidad de muestra mezclada con la primera disolución en la etapa (a) es aproximadamente de 5,0 ml.

La cantidad de la primera disolución que se puede mezclar con la muestra en la etapa (a) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml. La primera disolución preferiblemente comprende un reactivo alcalino. Los reactivos alcalinos que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, etanolamina, fosfato trisódico, hidróxido sódico e hidróxido potásico. La primera disolución puede comprender también un detergente. Lo más preferible, la primera disolución comprende un reactivo alcalino, un detergente y un agente quelante. Los detergentes que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido cólico, Triton X-100, ácido deoxicólico, cetrimida, N-dodecilsulfobetaina, digitonina, n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido, ácido glicodeoxicólico, n-lauroilsarcosina, sulfato de laurilo, saponina, monooleato de sorbitán polioxietilenado, polietilenglicol P-1,1,3,3-tetrametilbutilfenil éter, y derivados polioxietilenados de ácidos grasos. Los agentes quelantes que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, EGTA y EDTA.

En una forma de realización preferida, la primera disolución comprende hidróxido sódico, Triton X-100 y EDTA. Más concretamente, la primera disolución comprende hidróxido sódico 0,2 N, Triton X-100 al 1,0% y EDTA 1mM. La cantidad de esta primera disolución que se puede mezclar con la muestra en la etapa (a) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml. Preferiblemente, la cantidad de esta primera disolución mezclada con la muestra en la etapa (a) es aproximadamente de 5,0 ml.

En otra forma de realización preferida, la primera disolución comprende una disolución ácida con un pH en el intervalo entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 5,5. Preferiblemente, la disolución ácida comprende acetato o citrato. Además, la disolución ácida preferiblemente comprende uno o más de los siguientes: un detergente, una sal, un agente quelante y un alcohol. Se puede usar cualquiera de los detergentes y agentes quelantes anteriormente mencionados aunque se prefiere que la disolución ácida incluya uno de los detergentes cetrimida o N-dodecilsulfobetaina.

El procedimiento anteriormente mencionado proporciona la separación de los microorganismos del medio y del volumen de la primera disolución y elimina el medio y el volumen de la primera disolución del recipiente. Preferiblemente, los microorganismos se pueden separar del medio y del volumen de la primera disolución por centrifugación o filtración. Lo más preferible, los microorganismos se separan del medio y del volumen de la primera disolución centrifugando durante diez (10) minutos a  $\geq 1,000$  G para peletizar los microorganismos. Preferiblemente, el medio es un medio de cultivo.

La etapa (c) del procedimiento anterior proporciona la adición de una segunda disolución al recipiente para volver a suspender los microorganismos. Una vez la segunda disolución se ha añadido al recipiente, el recipiente debe someterse a vortización.

La cantidad de la segunda disolución que se puede añadir al recipiente en la etapa (c) está comprendida entre aproximadamente 0,05 ml y aproximadamente 5 ml. Preferiblemente, la segunda disolución comprende una disolución ácida y/o un tampón como Tris, HEPES, MOPS y fosfato. Los tampones que se pueden usar con la presente invención tienen un pKa en el intervalo entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 9,0. Más preferiblemente, los tampones que se pueden usar con la presente invención tienen un pKa en el intervalo entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.

Preferiblemente, la segunda disolución comprende un detergente y/o una sal. Los detergentes que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido cólico, deoxiácido cólico, cetrimida, N-dodecilsulfobetaina, digitonina, n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido, glicodeoxiácido cólico, n-lauroilsarcosina, sulfato de laurilo, saponina, monooleato de sorbitán polioxietilenado, polietilenglicol P-1,1,3,3-tetrametilbutilfenil éter, derivados polioxietilenados de ácidos grasos y Triton X-100. Las sales que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cloruro potásico, cloruro sódico, cloruro magnésico, sulfato magnésico and cloruro cálcico.

En una forma de realización preferida, la segunda disolución comprende Tris, cloruro sódico y Tween 80. Más concretamente, la segunda disolución comprende Tris 0,1 M (pH 7,2), cloruro sódico 0,15 M y Tween 80 al 0,5%. La cantidad de esta segunda disolución que se puede añadir al recipiente en la etapa (c) está comprendida entre aproximadamente 0,05 ml y aproximadamente 5 ml. Preferiblemente, la cantidad de esta segunda disolución añadida al recipiente en la etapa (c) está comprendida entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,0 ml.

## ES 2 320 350 T3

La etapa (d) del procedimiento anterior proporciona detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de la etapa (c). Esto se consigue preferiblemente usando un test de aglutinación como el test Slidex Staph Plus. Preferiblemente, de 20 a 40  $\mu\text{l}$  de la suspensión resultante de la etapa (c) se añade a una gota del control y a continuación se ensaya usando un test Slidex Staph Plus. Alternativamente, se puede usar un test Staphylect Plus de Oxoid.

La presente invención también proporciona otro procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra. Este procedimiento comprende las etapas de:

(a) preparar una muestra que comprende un medio, microorganismos y plasma, suero, sangre o un componente de la sangre, de los microorganismos sospechosos de comprender *Staphylococcus aureus*;

(b) mezclar la muestra con una primera disolución que comprende un reactivo alcalino, un detergente y un agente quelante en un recipiente;

(c) separar los microorganismos del medio, el volumen de la primera disolución y el volumen de la plasma, suero, sangre o componente de la sangre y eliminar el medio, el volumen de la primera disolución y el volumen de plasma, suero, sangre o componente de la sangre del recipiente;

(d) añadir una segunda disolución que comprende una disolución ácida y/o un tampón, un detergente y una sal al recipiente para volver a suspender los microorganismos; y

(e) detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de la etapa (d) usando un test de aglutinación.

La etapa (a) proporciona la preparación de una muestra que comprende un medio, microorganismos y plasma, suero, sangre o un componente de la sangre. El tipo de muestra a ensayar determinará cómo debe prepararse la muestra. Las muestras que se pueden usar en los procedimientos de la presente invención se pueden obtener de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitación a, sangre, productos sanguíneos, tejido, ascites, medios de cultivo, fluidos corporales, piel, pus, especímenes uro-genitales, heces, alimentos, bebidas, productos cosméticos, productos farmacéuticos, productos para el cuidado de la salud, superficies como suelos y mesas, y partículas aéreas como polen y polvo. La muestra será una muestra que sea sospechosa de tener microorganismos, en concreto, *Staphylococcus aureus*. La muestra puede haber sido ya ensayada para la presencia de microorganismos y haber dado positivo para los microorganismos. La muestra puede requerir la adición de un medio y/o la muestra puede requerir la adición de plasma, suero, sangre o un componente de la sangre. La cantidad de medio y/o plasma, suero, sangre o componente de la sangre a añadir, si es necesario, será dependiente del número estimado de microorganismos en la muestra y puede ser establecida fácilmente por una persona experta en la técnica.

La etapa (b) proporciona que la muestra y la primera disolución se mezclen en un recipiente y esto se puede llevar a cabo sometiendo brevemente el recipiente a vortización. El recipiente es preferiblemente un tubo cónico.

La cantidad de muestra que se puede mezclar con la primera disolución en la etapa (b) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml. Preferiblemente, la cantidad de muestra mezclada con la primera disolución en la etapa (b) es aproximadamente de 5,0 ml.

La cantidad de la primera disolución que se puede mezclar con la muestra en la etapa (b) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml. La primera disolución preferiblemente comprende un reactivo alcalino. Los reactivos alcalinos que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, etanolamina, fosfato trisódico, hidróxido sódico e hidróxido potásico. La primera disolución puede también comprender un detergente. Lo más preferible, la primera disolución comprende un reactivo alcalino, un detergente y un agente quelante. Los detergentes que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido cólico, Triton X-100, deoxiácido cólico, cetrimida, N-docecilsulfobetaína, digitonina, n-docecil- $\beta$ -D-maltósido, glicodeoxiácido cólico, n-lauroilsarcosina, sulfato de laurilo, saponina, monooleato de sorbitán polioxietileno, polietilenglicol P-1,1,3,3-tetrametilbutilfenil éter y derivados polioxietileno de ácidos grasos. Los agentes quelantes que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, EGTA y EDTA.

En una forma de realización preferida, la primera disolución comprende hidróxido sódico, Triton X-100 y EDTA. Más concretamente, la primera disolución comprende hidróxido sódico 0,2 N Triton X-100 al 1,0% y EDTA 1mM. La cantidad de esta primera disolución que se puede mezclar con la muestra en la etapa (b) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml. preferiblemente, la cantidad de esta primera disolución mezclada con la muestra en la etapa (b) es aproximadamente de 5,0 ml.

En otra forma de realización preferida, la primera disolución comprende una disolución ácida con un pH en el intervalo entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 5,5. Preferiblemente, la disolución ácida comprende acetato o citrato. Además, la disolución ácida preferiblemente comprende uno o más de lo siguiente: un detergente, una sal, un agente quelante y un alcohol. Se puede usar cualquiera de los detergentes y agentes quelantes anteriormente mencionados aunque se prefiere que la disolución ácida incluya uno de los detergentes cetrimida o N-docecilsulfobetaína.

## ES 2 320 350 T3

El procedimiento anterior proporciona separar los microorganismos del medio, el volumen de la primera disolución y el volumen de plasma, suero, sangre o componente de la sangre y eliminar el medio, el volumen de la primera disolución y el volumen de la plasma, suero, sangre o componente de la sangre del recipiente. Preferiblemente, los microorganismos se pueden separar del medio, el volumen de la primera disolución y el volumen de la plasma, suero, sangre o componente de la sangre por centrifugación o filtración. Lo más preferible, los microorganismos se separan del medio, el volumen de la primera disolución y el volumen de la plasma, suero, sangre o componente de la sangre centrifugando durante diez (10) minutos a  $\geq 1.000$  G para peletizar los microorganismos. Preferiblemente, el medio es un medio de cultivo.

La etapa (d) del procedimiento anterior proporciona la adición de una segunda disolución al recipiente para volver a suspender los microorganismos. Una vez que se ha añadido al recipiente la segunda disolución, el recipiente debe someterse a vortización.

La cantidad de la segunda disolución que se puede añadir al recipiente en la etapa (d) está comprendida entre aproximadamente 0,05 ml y aproximadamente 5 ml. Preferiblemente, la segunda disolución comprende una disolución ácida y/o un tampón como Tris, HEPES, MOPS y fosfato. Los tampones que se pueden usar con la presente invención tienen un pKa en el intervalo entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 9,0. Más preferiblemente, los tampones que se pueden usar con la presente invención tienen un pKa en el intervalo entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.

Preferiblemente, la segunda disolución comprende un detergente y/o una sal. Los detergentes que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido cólico, deoxiácido cólico, cetrimida, N-docecilsulfo-betaína, digitonina, n-docecil- $\beta$ -D-maltósido, glicodeoxiácido cólico, n-lauroilsarcosina, sulfato de laurilo, saponina, monooleato de sorbitán polioxietileno, polietilenglicol P-1,1,3,3-tetrametilbutilfenil éter, derivados polioxietileno de ácidos grasos and Triton X-100. Las sales que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cloruro potásico, cloruro sódico, cloruro magnésico, sulfato magnésico and coluro cálcico.

En una forma de realización preferida, la segunda disolución comprende Tris, cloruro sódico y Tween 80. Más concretamente, la segunda disolución comprende Tris 0,1 M (pH 7.2), cloruro sódico 0,15 M y Tween 80 0,5%. La cantidad de esta segunda disolución que se puede añadir al recipiente en la etapa (d) está comprendida entre aproximadamente 0,05 ml y aproximadamente 5 ml. Preferiblemente, la cantidad de esta segunda disolución añadida al recipiente en la etapa (d) está comprendida entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,0 ml.

La etapa (e) del procedimiento anterior proporciona detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de la etapa (d). Esto se lleva a cabo preferiblemente usando un test de aglutinación tal como el test Slidex Staph Plus. Preferiblemente, de 20 a 40  $\mu$ l de la suspensión resultante de la etapa (d) se añade a una gota del control y a continuación se ensaya usando un test Slidex Staph Plus test. Alternativamente se puede usar un test Staphytest Plus de Oxoid.

La presente invención también proporciona otro procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra. Este procedimiento comprende las etapas de:

(a) mezclar una muestra que comprende un medio, un adsorbente y microorganismos con una primera disolución en un recipiente, de los microorganismos sospechosos de comprender *Staphylococcus aureus*;

(b) separar adsorbente y microorganismos del medio y el volumen de la primera disolución y eliminar el medio y el volumen de la primera disolución del recipiente;

(c) añadir una segunda disolución al recipiente para volver a suspender el adsorbente y los microorganismos; y

(d) detectar *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de la etapa (c) usando un test de aglutinación.

Las muestras que se pueden usar en este procedimiento de la presente invención se puede obtener de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitación a, sangre, productos sanguíneos, tejido, ascites, medios de cultivo, fluidos corporales, piel, pus, especímenes uro-genitales, heces, alimentos, bebidas, productos cosméticos, productos farmacéuticos, productos para el cuidado de la salud, superficies como suelos y mesas, y partículas aéreas como polen y polvo. La muestra será una muestra que sea sospechosa de tener microorganismos, en particular, *Staphylococcus aureus*. La muestra puede haber sido ya ensayada para la presencia de microorganismos y haber dado positivo para los microorganismos. La muestra puede requerir la adición de un medio antes de la etapa (a) y/o la muestra puede requerir la adición de un adsorbente antes de la etapa (a). La cantidad de medio y/o adsorbente a añadir, si fuera necesario, sería dependiente del número estimado de microorganismos en la muestra y puede determinarse fácilmente por una persona experta en la técnica.

El plasma, suero, sangre o componente de la sangre se mezcla preferiblemente con la muestra y la primera disolución en la etapa (a). Si el plasma, suero, sangre o componente de la sangre se mezclan con la muestra y la primera disolución, el volumen de plasma, suero, sangre o componente de la sangre se separan junto con el medio y el volumen de la primera disolución de los microorganismos y se eliminan del recipiente durante la etapa (b). La muestra, sin embargo, puede obtenerse de una fuente como sangre, productos sanguíneos, tejido, fluidos corporales, piel, pus,

## ES 2 320 350 T3

etc., y por tanto ya incluye plasma, suero, sangre o un componente de la sangre. En esos casos, el volumen de plasma, suero, sangre o componente de la sangre se separa junto con el medio y el volumen de la primera disolución de los microorganismos y se eliminan del recipiente durante la etapa (b).

5 La etapa (a) proporciona que la muestra y primera disolución se mezclen en un recipiente y esto se puede llevar a cabo sometiendo brevemente el recipiente a vortización. El recipiente es preferiblemente un tubo cónico.

10 El adsorbente se selecciona entre el grupo constituido por óxido de aluminio, silicatos de aluminio hidratado nativo coloidal, silicatos de aluminio alcalinos cristalinos hidratados, sílice, crústulas silíceas, fragmentos de varias especies de diatomeas, carbón amorfo, resinas de intercambio iónico, adsorbentes de resina polimérica y resina de poliestireno reticulada con divinil benceno.

15 La cantidad de muestra que se puede mezclar con la primera disolución en la etapa (a) es de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 10 ml. Preferiblemente, la cantidad de muestra mezclada con la primera disolución en la etapa (a) es aproximadamente de 5,0 ml.

20 La cantidad de la primera disolución que se puede mezclar con la muestra en la etapa (a) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml. La primera disolución preferiblemente comprende un reactivo alcalino. Los reactivos alcalinos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, etanolamina, fosfato trisódico, hidróxido sódico e hidróxido potásico. La primera disolución puede también comprender un detergente. Lo más preferible, la primera disolución comprende un reactivo alcalino, un detergente y un agente quelante. Los detergentes que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido cólico, deoxiácido cólico, cetrimida, N-docecilsulfobetaína, digitonina, n-docecil- $\beta$ -D-maltósido, glicodeoxiácido cólico, n-lauroilsarcosina, sulfato de laurilo, saponina, monooleato de sorbitán polioxietilenado, polietilenglicol P-1,1,3,3-tetrametilbutilfenil éter, Triton X-100 y derivados polioxietilenados de ácidos grasos. Los agentes quelantes que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, EGTA y EDTA.

30 En una forma de realización preferida, la primera disolución comprende hidróxido sódico, Triton X-100 y EDTA. Más concretamente, la primera disolución comprende hidróxido sódico 0,2 N, Triton X-100 al 1,0% y EDTA 1 mM. La cantidad de esta primera disolución que se puede mezclar con la muestra en la etapa (a) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml. Preferiblemente, la cantidad de esta primera disolución mezclada con la muestra en la etapa (a) es aproximadamente de 5,0 ml.

35 En otra forma de realización preferida, la primera disolución comprende una disolución ácida con un pH en el intervalo entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 5,5. Preferiblemente, la disolución ácida comprende acetato o citrato. Además, la disolución ácida preferiblemente comprende uno o más de lo siguiente: un detergente, una sal, un agente quelante y un alcohol. Se puede usar cualquiera de los detergentes y agentes quelantes anteriormente mencionados aunque se prefiere que la disolución ácida incluya uno de los detergentes cetrimida o N-docecilsulfobetaína.

40 El procedimiento anterior proporciona separar el adsorbente y los microorganismos del medio y el volumen de la primera disolución y eliminar el medio y el volumen de la primera disolución del recipiente. Preferiblemente, el adsorbente y los microorganismos se pueden separar del medio y el volumen de la primera disolución por centrifugación o filtración. Lo más preferible, el adsorbente y los microorganismos se separan del medio y el volumen de la primera disolución por centrifugación durante diez (10) minutos a  $\geq 1.000$  G para romper el adsorbente y los microorganismos. Preferiblemente, el medio es un medio de cultivo.

50 La etapa (c) del procedimiento anterior proporciona añadir una segunda disolución al recipiente para volver a suspender el adsorbente y los microorganismos. Una vez la segunda disolución se ha añadido al recipiente, el recipiente debe someterse a vortización.

55 La cantidad de la segunda disolución que se puede añadir al recipiente en la etapa (c) está comprendida entre aproximadamente 0,05 ml y aproximadamente 5 ml. Preferiblemente, la segunda disolución comprende una disolución ácida y/o un tampón como Tris, HEPES, MOPS y fosfato. Los tampones que se pueden usar con la presente invención tienen un pKa en el intervalo entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 9,0. Más preferiblemente, los tampones que se pueden usar con la presente invención tienen un pKa en el intervalo entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.

60 Preferiblemente, la segunda disolución comprende un detergente y/o una sal. Los detergentes que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido cólico, deoxiácido cólico, cetrimida, N-docecilsulfobetaína, digitonina, n-docecil- $\beta$ -D-maltósido, glicodeoxiácido cólico, n-lauroilsarcosina, sulfato de laurilo, Triton X-100, saponina, monooleato de sorbitán polioxietilenado, polietilenglicol P-1,1,3,3-tetrametilbutilfenil éter y derivados polioxietilenados de ácidos grasos. Las sales que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cloruro potásico, cloruro sódico, cloruro magnésico, sulfato magnésico y coluro cálcico.

65 En una forma de realización preferida, la segunda disolución comprende Tris, cloruro sódico y Tween 80. Más concretamente, la segunda disolución comprende 0,1 M Tris (pH 7,2), cloruro sódico 0,15 M y Tween 80 L 0,5%. La cantidad de esta segunda disolución que se puede añadir al recipiente en la etapa (c) está comprendida entre

## ES 2 320 350 T3

aproximadamente 0,05 y aproximadamente 5 ml. Preferiblemente, la cantidad de esta segunda disolución añadida al recipiente en la etapa (c) está comprendida entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,0 ml.

La etapa (d) del procedimiento anterior proporciona detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de la etapa (c). Esto se lleva a cabo preferiblemente usando un test en látex como el test Slidex Staph Plus. Preferiblemente, de 20 a 40  $\mu$ l de la suspensión resultante de la etapa (c) se añaden a una gota del control y a continuación se ensaya usando un test Slidex Staph Plus. Alternativamente, se puede usar un test Staphylect Plus de Oxoid.

Otra forma de realización de la presente invención proporciona detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra mediante:

(a) preparar una muestra que comprende un medio y microorganismos, los microorganismos sospechosos de comprender *Staphylococcus aureus*;

(b) mezclar la muestra con una primera disolución en un recipiente;

(c) separar los microorganismos del medio y un volumen de la primera disolución y eliminar el medio y el volumen de la primera disolución del recipiente;

(d) añadir una segunda disolución al recipiente para volver a suspender los microorganismos; y

(e) detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de la etapa (d) usando un test de aglutinación.

En esta forma de realización, el plasma, suero, sangre o componente de la sangre se puede añadir a la muestra en la etapa (a) y separar y eliminar del recipiente en la etapa (c) junto con el medio y el volumen de la primera disolución.

La etapa (a) proporciona la preparación de una muestra que comprende un medio y microorganismos. El tipo de muestra a ensayar determinará cómo se preparará la muestra. Las muestras usadas en este procedimiento y en cualquier procedimiento para detectar *S. aureus* de acuerdo con la presente invención se pueden obtener de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitación a, sangre, productos sanguíneos, tejido, ascites, medios de cultivo, fluidos corporales, piel, pus, especímenes uro-genitales y heces. Las muestras se pueden obtener para detección de alimentos y bebidas; de productos cosméticos, farmacéuticos, y para el cuidado de la salud; de superficies como suelos, mesas y similares; y de partículas aéreas, como polen y polvo. La muestra será una muestra que sea sospechosa de tener microorganismos, en particular, *Staphylococcus aureus*. La muestra puede haber sido ya ensayada para la presencia de microorganismos y haber dado positivo para microorganismos. La muestra a preparar durante la etapa (a) incluye medio. Si la muestra no tiene medio ninguno, se necesitará añadir medio a la muestra durante la etapa (a). La cantidad de medio a añadir a la muestra durante la etapa (a), si fuera necesario, dependerá del número estimado de microorganismos en la muestra y esto será fácilmente determinable por una persona experta en la técnica.

La etapa (b) de esta forma de realización proporciona que la muestra y primera disolución se mezclen en un recipiente y esto se puede llevar a cabo sometiendo brevemente el recipiente a vortización. El recipiente es preferiblemente un tubo cónico. La cantidad de muestra que se puede mezclar con la primera disolución en la etapa (b) es de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 10 ml. Preferiblemente, la cantidad de muestra mezclada con la primera disolución en la etapa (b) es aproximadamente de 5,0 ml. La cantidad de la primera disolución que se puede mezclar con la muestra en la etapa (b) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml. La primera disolución preferiblemente comprende un reactivo alcalino. Los reactivos alcalinos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, etanolamina, fosfato trisódico, hidróxido sódico e hidróxido potásico. La primera disolución puede también comprender un detergente. Lo más preferible, la primera disolución comprende un reactivo alcalino, un detergente y un agente quelante. Se puede usar cualquiera de los detergentes y agentes quelantes anteriormente mencionados.

Se prefiere en esta forma de realización que la primera disolución comprenda hidróxido sódico, Triton X-100 y EDTA. Más concretamente, la primera disolución comprende hidróxido sódico 0,2 N, Triton X-100 al 1,0% y EDTA 1 mM. La cantidad de esta primera disolución que se puede mezclar con la muestra en la etapa (b) está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml. Preferiblemente, la cantidad de esta primera disolución mezclada con la muestra en la etapa (b) es aproximadamente de 5,0 ml.

Alternativamente, la primera disolución puede comprender una disolución ácida con un pH en el intervalo entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 5,5. Preferiblemente, la disolución ácida comprende acetato o citrato. Además, la disolución ácida preferiblemente comprende uno o más de lo siguiente: un detergente, una sal, un agente quelante y un alcohol. Se puede usar cualquiera de los detergentes y agentes quelantes anteriormente mencionados aunque se prefiere que la disolución ácida incluya uno de los detergentes cetrimida o N-docecilsulfobetaina.

Este procedimiento proporciona separar los microorganismos del medio y el volumen de la primera disolución y eliminar el medio y el volumen de la primera disolución del recipiente. Preferiblemente, los microorganismos se pueden separar del medio y el volumen de la primera disolución por centrifugación o filtración. Lo más preferible,

## ES 2 320 350 T3

los microorganismos se separan del medio y el volumen de la primera disolución por centrifugación durante diez (10) minutos a  $\geq 1.000$  G para peletizar los microorganismos.

5 La etapa (d) de este procedimiento proporciona añadir una segunda disolución al recipiente para volver a suspender los microorganismos. Una vez la segunda disolución se ha añadido al recipiente, el recipiente debe someterse a vortización. La cantidad de la segunda disolución que se puede añadir al recipiente en la etapa (d) está comprendida entre aproximadamente 0,05 ml y aproximadamente 5 ml. Preferiblemente, la segunda disolución comprende una disolución ácida y/o un tampón como Tris, HEPES, MOPS y fosfato. Los tampones que se pueden usar con la presente invención tienen un pKa en el intervalo entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 9,0. Más preferiblemente, los  
10 tampones que se pueden usar con la presente invención tienen un pKa en el intervalo entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0. Preferiblemente, la segunda disolución comprende un detergente y/o una sal. Se puede usar cualquiera de los detergentes y sales anteriormente mencionados

15 Se prefiere que la segunda disolución comprenda Tris, cloruro sódico y Tween 80. Más concretamente, la segunda disolución comprende Tris 0,1 M (pH 7,2), cloruro sódico 0,15 M y Tween 80 al 0,5%. La cantidad de esta segunda disolución que se puede añadir al recipiente en la etapa (d) está comprendida entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 5 ml. Preferiblemente, la cantidad de esta segunda disolución añadida al recipiente en la etapa (d) está comprendida entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,0 ml.

20 La etapa (e) del procedimiento anterior proporciona detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de la etapa (d). Esto se realiza preferiblemente usando un test en látex tal como el test Slidex Staph Plus. Preferiblemente, de 20 a 40  $\mu$ l de la suspensión resultante de la etapa (d) se añaden a una gota del control y a continuación se ensaya usando un test Slidex Staph Plus. Alternativamente, se puede usar un test Staphytest Plus de Oxoid.

25 El término “adsorbente” tal como se usa en los procedimientos de la presente invención se selecciona preferiblemente del grupo anteriormente proporcionado, sin embargo, para los objetivos de esta solicitud, el término “adsorbente” incluye todos los materiales adsorbentes que neutralizan, enlazan, e inhiben sustancias antimicrobianas. Estos adsorbentes incluyen resinas según se definen en la Patente de los Estados Unidos 4.632.902, y adsorbentes no resinosos.  
30

El término “resina” tal como se usa en el presente documento es un subtipo de adsorbentes, y además se define para incluir resinas naturales y sintéticas, por ejemplo, ion resinas de intercambio iónico, adsorbentes de resinas poliméricas no funcionales y, en particular, resinas de poliestireno reticuladas con divinilbenceno.  
35

Los “adsorbentes no resinosos” tal como se usa en el presente documento son otro subtipo de adsorbentes y se definen como adsorbentes no resinosos y tamices moleculares naturales y sintéticos que se pueden usar para clarificar, desodorizar, decolorar y filtrar. Algunos de estos adsorbentes no resinosos son los mismos que los usados en la producción de antibióticos para retirar los antibióticos del medio de cultivo en el que crecen las bacterias que producen los antibióticos.  
40

Estos adsorbentes no resinosos incluyen varias formas de 1) óxido de aluminio (alúmina), 2) silicatos de aluminio hidratado nativo coloidal (arcillas), como bentonita, caolín, y tierra de Fuller, 3) silicatos de aluminio alcalinos cristalinos hidratados (zeolitas de sodio o calcio), 4) sílice (gel de sílice, perlas de sílice) como Davisil, 5) frústulas silíceas y fragmentos de varias especies de diatomeas (tierra de infusorios, tierra de diatomeas) como Celite® (Manville Products Corporation, Denver, Colo., EEUU) y 6) carbón amorfo (en particular, carbón activado) como Carboraffin, Norit® (American Norit Company Inc., Jacksonville, Fla., EEUU), Opocerbyl, y Ultracarbon. También se puede usar como adsorbente el carbón activado natural, que se ha usado para evitar los efectos letales de la oxidación en medio de transporte y medio de crecimiento. Este medio se ha usado también para el transporte de organismos peligrosos como *Neisseria gonorrhoeae* y para el cultivo de especies de *Legionella*. Los adsorbentes no resinosos no requieren pretratamiento con un tensioactivo con el fin de activarlos. El tratamiento con tensioactivos puede incluso disminuir las capacidades de adsorción de estos materiales.  
50

Muchos de estos adsorbentes no resinosos eliminan sustancias antimicrobianas en cultivo. Los adsorbentes no resinosos preferidos son silicatos de aluminio hidratado nativo coloidal (arcillas), y los grupos de materiales adsorbentes de los carbonos amorfos (carbón activado) Los materiales adicionalmente preferidos son la tierra de Fuller o el carbón activado usados en solitario o en combinación.  
55

Las muestras usadas en los procedimientos para detectar *S. aureus* de acuerdo con la presente invención contienen medios. Preferiblemente, el medio es medio de cultivo y el medio de cultivo puede incluir medios generalistas como el caldo de soja tríptico, caldo de infusión de cerebro-corazón, caldo de Columbia, y caldo de Brucella.  
60

En las disoluciones primera y segunda se pueden incluir tensioactivos o potenciadores de la absorción adecuados, tal como se ha descrito brevemente con anterioridad. Otros tensioactivos o potenciadores de la absorción adecuados que se pueden usar en las disoluciones primera y segunda incluyen, por ejemplo, ácido oleico, derivados polioxietilenados de ácidos grasos, ésteres parciales de sorbitol anhidro, como por ejemplo, Tween 20, polioxil 40 estearato, polioxietileno 50 estearato, fusiato, sales biliares, octoxinol y sus combinaciones. Los tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos no iónicos, aniónicos y catiónicos.  
65

## ES 2 320 350 T3

La presente invención se detalla además en el siguiente Ejemplo que se ofrece a efectos de ilustración y que no se pretende que limite la invención en forma alguna. Se utilizan técnicas convencionales bien conocidas en la técnica o bien técnicas específicas que se detallan a continuación.

### 5 Ejemplo

Se inocularon botellas de cultivo de plástico BacT/ALERT SA (bioMerieux, Inc.) con 10 ml de sangre humana normal y uno de treinta y tres (33) aislados estafilocócicos (17 *S. aureus*, 16 adicionales que son aislados no de *S. aureus*). Las cepas de ensayo se identificaron usando un instrumento VITEK 2 (bioMerieux, Inc.) y un ensayo de coagulasa en tubo. Las muestras de caldo de las botellas positivas se mezclaron con un volumen igual de una primera disolución (Disolución A) y se centrifugaron para peletizar los microorganismos. El pelet se volvió a suspender en un pequeño volumen de una segunda disolución (Disolución B) y se ensayó con los reactivos en látex Slidex Staph Plus. Las muestras de caldo (10 y 100  $\mu$ l) se ensayaron también usando el ensayo de coagulasa en tubo. Una descripción más detallada del procedimiento es como sigue:

1. Añadir 5 ml de una muestra procedente de una botella BacT/ALERT SA positiva a 5 ml de Disolución A en un tubo cónico.
2. Mezclar el contenido del tubo y centrifugar durante 10 min a  $\geq 1.000G$  para peletizar los microorganismos.
3. Eliminar todo el sobrenadante.
4. Volver a suspender completamente el pelet en 0,5-1,0 ml de Disolución B sometiendo el tubo a vortización.
5. Añadir 20-40  $\mu$ l de la suspensión bacteriana resultante a 1 gota del control y ensayo usando los reactivos en látex Slidex Staph Plus (u otro kit comercialmente disponible, por ejemplo, Staphytest Plus de Oxoid).
6. Leer la reacción en el látex de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La disolución A incluía NaOH 0,2N, Triton X-100 al 1,0% y EDTA 1mM, y la Disolución B incluía Tris 0,1M pH 7,2, NaCl 0,15M y Tween 80 al 0,5%. Otros compuestos fuertemente básicos como etanolamina, hidróxido potásico y fosfato trisódico se pueden sustituir por hidróxido sódico.

Los resultados de este experimento se muestran a continuación en la Tabla 1. En particular, la Tabla 1 muestra los resultados del ensayo directo de cultivos positivos de sangre SA con el ensayo Slidex Staph Plus Latex. Las reacciones en látex se clasificaron con una reactividad de 1+ a 4+ según se describe en las instrucciones del fabricante.

Se prepararon también suspensiones a partir de unas pocas cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* usando un procedimiento de centrifugación en dos etapas y un procedimiento de centrifugación en cuatro etapas. Para el primer procedimiento, se centrifugaron aproximadamente 7 ml de caldo, a continuación se eliminó la parte superior, se añadió solución salina y el caldo se centrifugó de nuevo y se volvió a suspender en un pequeño volumen de solución salina. El Segundo procedimiento implica preparar el pelet con solución salina seguido por dos lavados con agua destilada, volviendo a suspender el pelet final en solución salina. Los pelet del caldo de cada procedimiento de centrifugación se ensayaron con los reactivos en látex Slidex Staph Plus. La Tabla 2 muestra los resultados de una comparación directa del procedimiento novedoso de la presente invención con los procedimientos de centrifugación en 2 etapas y en 4 etapas.

(Tabla pasa a página siguiente)

**TABLA 1**

Designación de la cepa	Vitek 2 ID (ensayo de 3 h)	Coagulasa en tubo en colonia		Coagulasa en tubo en 100 ul de caldo		Coagulasa en tubo en 10 ul de caldo		Tiempo de detección en BETA <sup>a</sup>	<sup>b</sup> Slidex Staph Plus sobre pelet del caldo
		4 h a 37° C	24 h a 37° C	4 h a 37° C	24 h a 37° C	4 h a 37° C	24 h a 37° C		
ATCC 43300	<i>S. aureus</i>	4	4	4	4	4	4	11,7	4
ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	4	4	0	4	4	4	11,7	2
ATCC 12600	<i>S. aureus</i>	3	4	0	3	4	4	11,3	3
ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	4	4	3	3	4	4	10,7	4
ATCC 6538	<i>S. aureus</i>	4	4	4	4	4	4	12,0	2
OTC 80	<i>S. aureus</i>	4	4	4	4	4	4	11,5	4
UCLA 114	<i>S. aureus</i>	4	4	0	3	4	4	10,8	3
UCLA 120	<i>S. aureus</i>	3	4	0	0	1	3	12,0	4
UCLA 121	<i>S. aureus</i>	2	4	0	0	3	3	11,8	3
Duke 5	<i>S. aureus</i>	3	4	4	4	4	4	11,5	4
BJ0242	<i>S. aureus</i>	4	4	3	4	4	4	12,7	3
BJ0159	<i>S. aureus</i>	4	4	4	4	4	4	12,7	3
D14790	<i>S. aureus</i>	4	4	4	4	4	4	11,3	2
D14906	<i>S. aureus</i>	3	4	4	4	4	4	12,7	4
D14908	<i>S. aureus</i>	4	4	4	4	4	4	11,8	2
D14914	<i>S. aureus</i>	4	4	4	4	4	4	12,5	4
D15077	<i>S. aureus</i>	4	4	4	4	4	4	12,5	3
<b>Sensibilidad %</b>		<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>70,6%</b>	<b>88,2%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>		<b>100%</b>

(continuación)

Designación de la cepa	Vitek 2 ID (ensayo de 3 h)	Coagulasa en tubo en colonia		Coagulasa en tubo en 100 ul de caldo		Coagulasa en tubo en 10 ul de caldo		Tiempo de detección en BETA <sup>a</sup>	<sup>b</sup> Slidex Staph Plus sobre pelet del caldo
		4 h a 37° C	24 h a 37° C	4 h a 37° C	24 h a 37° C	4 h a 37° C	24 h a 37° C		
ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	16,0	neg
ATCC 14990	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	16,7	neg
ATCC 49134	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	16,2	neg
ATCC 29997	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	16,2	neg
71701B	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	15,8	neg
72401B	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	17,0	neg
7BE4727	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	15,8	neg
72701B	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	16,2	neg
72201B	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	21,2	neg
72001B	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	19,2	neg
72501B	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	15,8	Neg
72601B	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	15,8	neg
7BH6481	<i>S. capitis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	14,2	neg
7BV9227	<i>S. warneri</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	15,8	neg
73001B	<sup>c</sup> <i>S. chromogenes</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	17,7	neg
# 155	<sup>d</sup> <i>S. saprophyticus</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	20,2	Neg
	<b>Especificidad %</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>		<b>100%</b>

<sup>a</sup> BacT/Alert

<sup>b</sup> sensibilidad y especificidad del 100% en 15 min, con un pretratamiento con tampón patentado

<sup>c</sup> débil ID, la repetición resultó inconclusiva

<sup>d</sup> baja discriminación de ID (*S. saprophyticus* o *S. simulans*)

## ES 2 320 350 T3

TABLA 2

Designación de la cepa	Vitek 2 ID	Tiempo de detección en BTA	Procedimiento novedoso	Centrifugación diferencial tradicional	
			Resultado en látex, tampón A/B	Resultado en látex, 2 etapas	Resultado en látex, 4 etapas
ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	12,8	2+	neg	neg
ATCC 12600	<i>S. aureus.</i>	11,5	4+	neg	neg
ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	11,7	3+	neg	neg
D14906	<i>S. aureus</i>	13,7	3+	neg	neg
D15077	<i>S. aureus</i>	13,8	1,5+	neg	neg
	<b>Promedio =</b>	<b>12,7</b>	<b>2,7+</b>	<b>neg</b>	<b>neg</b>
ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i>	16,8	neg	neg	neg
ATCC 14990	<i>S. epidermidis</i>	16,5	neg	neg	neg
ATCC 49134	<i>S. epidermidis</i>	18,8	neg	neg	neg
71701B	<i>S. epidermidis</i>	17,7	neg	neg	neg
72501B	<i>S. epidermidis</i>	16,3	neg	neg	neg
	<b>Promedio =</b>	<b>17,2</b>	<b>neg</b>	<b>neg</b>	<b>neg</b>

Como es evidente de las Tablas 1 y 2, las reacciones positivas de *S. aureus* en látex fueron visibles para todas las suspensiones de *S. aureus* preparadas usando las soluciones descritas, pero no todas las cepas de *S. aureus* ensayadas fueron no reactivas dando como resultado un 100% de sensibilidad y especificidad. Los resultados en látex estuvieron disponibles en aproximadamente 15 minutos. Las suspensiones de *S. aureus* preparadas usando el procedimiento tradicional de centrifugación diferencial fueron negativas. Los resultados en látex estuvieron completamente de acuerdo con los resultados de coagulasa en tubo y VITEK 2.

El procedimiento descrito y usado en este experimento proporciona un procedimiento rápido y barato para el procesamiento de botellas de cultivo de sangre convencionales BacT/ALERT con soluciones, mejorando espectacularmente la sensibilidad de un test en látex rápido para *S. aureus*. El procedimiento descrito permite confirmar *S. aureus* a los 15 minutos de obtener el resultado de la cepa gran de una botella de cultivo de sangre BacT/ALERT positiva y proporciona dirección para un ensayo de susceptibilidad y en consecuencia ayudar a la recuperación del paciente.

## ES 2 320 350 T3

### REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra, **caracterizado** porque comprende:

5 (a) mezclar una muestra que comprende un medio y microorganismos con una primera disolución que comprende un reactivo alcalino, un detergente y un agente quelante en un recipiente, dichos microorganismos sospechosos de comprender *Staphylococcus aureus*;

10 (b) separar dichos microorganismos de dicho medio y un volumen de dicha primera disolución y retirar dicho medio y el volumen de dicha primera disolución de dicho recipiente;

(c) añadir una segunda disolución que comprende una disolución ácida y/o un tampón, un detergente y una sal a dicho recipiente para volver a suspender dichos microorganismos; y

15 (d) detectar *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de (c) usando un test de aglutinación.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que de 0,1 a 10 ml de la dicha muestra se mezclan con la dicha primera disolución en (a).

20 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que de 0,1 a 10 ml de la dicha primera disolución se mezclan con la dicha muestra en (a).

25 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la dicha primera disolución comprende hidróxido sódico, Triton X-100 y EDTA.

5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 en el que de 0,1 a 10 ml de la dicha primera disolución se mezclan con la dicha muestra en (a).

30 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la dicha segunda disolución comprende Tris, cloruro sódico y Tween 80.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 en el que de 0,5 a 5 ml de la dicha segunda disolución se añaden a dicho recipiente en (c).

35 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que plasma, suero, sangre o un componente de la sangre se mezclan con la dicha muestra y la dicha primera disolución en (a).

40 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el dicho test de aglutinación es un test Slidex Staph Plus.

10. Un procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra **caracterizado** porque comprende:

45 (a) preparar una muestra que comprende un medio, microorganismos y plasma, suero, sangre o un componente de la sangre, dichos microorganismos sospechosos de comprender *Staphylococcus aureus*;

(b) mezclar la dicha muestra con una primera disolución que comprende un reactivo alcalino, un detergente y un agente quelante en un recipiente;

50 (c) separar dichos microorganismos de dicho medio, un volumen de dicha primera disolución y un volumen de dicho plasma, suero, sangre o componente de la sangre y retirar dicho medio, el volumen de dicha primera disolución y el volumen de dicho plasma, suero, sangre o componente de la sangre de dicho recipiente;

55 (d) añadir una segunda disolución que comprende una disolución ácida y/o un tampón, un detergente y una sal a dicho recipiente para volver a suspender dichos microorganismos; y

(e) detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la suspensión resultante de (d) usando un test de aglutinación.

60 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 en el que de 0,1 a 10 ml de la dicha muestra se mezclan con la dicha primera disolución en (b).

12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 en el que de 0,1 a 10 ml de la dicha primera disolución se mezclan con la dicha muestra en (b).

65 13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la dicha primera disolución comprende hidróxido sódico, Triton X-100 y EDTA.

## ES 2 320 350 T3

14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 en el que de 0,1 a 10 ml de la dicha primera disolución se mezclan con la dicha muestra en (b).

5 15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la dicha segunda disolución comprende Tris, cloruro sódico y Tween 80.

16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15 en el que de 0,05 a 5 ml de la dicha segunda disolución se añaden a dicho recipiente en (d).

10 17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 en el que de 0,05 a 5 ml de la dicha segunda disolución se añaden a dicho recipiente en (d).

15 18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 en el que el dicho test de aglutinación es un test Slidex Staph Plus.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65